



①⑨ **BUNDESREPUBLIK
DEUTSCHLAND**



**DEUTSCHES
PATENT- UND
MARKENAMT**

⑫ **Offenlegungsschrift**
⑩ **DE 100 26 713 A 1**

⑤① Int. Cl.7:
C 07 K 14/495

②① Aktenzeichen: 100 26 713.0
②② Anmeldetag: 30. 5. 2000
④③ Offenlegungstag: 6. 12. 2001

DE 100 26 713 A 1

⑦① Anmelder:
Sebald, Walter, Prof. Dr., 97074 Würzburg, DE

⑦④ Vertreter:
Grünecker, Kinkeldey, Stockmair & Schwanhäusser,
80538 München

⑦② Erfinder:
Sebald, Walter, Prof. Dr., 97074 Würzburg, DE;
Nickel, Joachim, 97222 Rimpf, DE

⑤⑤ Für die Beurteilung der Patentfähigkeit in Betracht
zu ziehende Druckschriften:

EP	08 91 985 A1
EP	07 23 013 A2
EP	06 91 349 A2
WO	96 03 433 A1
WO	95 16 034 A1

Die folgenden Angaben sind den vom Anmelder eingereichten Unterlagen entnommen

⑤④ Mutein einer Kette eines Proteins aus der Superfamilie des Wachstumsfaktors TGF- β

⑤⑦ Die vorliegende Erfindung betrifft Muteine einer Kette eines Proteins aus der Superfamilie des Wachstumsfaktors TGF- β mit antagonistischer und/oder partiell agonistischer Aktivität.

Die Faktoren der TGF- β Superfamilie üben im Organismus eine jeweils eigene spezifische Funktion aus. Eine Überexpression dieser Proteine kann für den betroffenen Patienten gravierende Folgen haben, z. B. ektope Knochenbildung oder Psoriasis. Um diesen pathophysiologischen Wirkungen begegnen zu können, sollen Hemmstoffe für diese Faktoren entwickelt werden.

Die Erfindung stellt Muteine einer Kette eines Proteins aus der Superfamilie des Wachstumsfaktors TGF- β zur Verfügung, die nach Bildung eines Homodimers antagonistisch und/oder partiell agonistische Aktivität aufweisen, wobei die Muteine an einer oder mehreren Positionen verändert sind, die im unveränderten Protein an einer niederaffinen Bindung des Proteins an seinen Rezeptor beteiligt sind.

Die erfindungsgemäßen Muteine sind von Interesse für die Prophylaxe und Behandlung von Erkrankungen, die durch eine Überexpression von Faktoren der TGF- β Superfamilie hervorgerufen werden.

DE 100 26 713 A 1

[0001] Die vorliegende Erfindung betrifft Muteine einer Kette eines Proteins aus der Superfamilie des Wachstumsfaktors TGF- β mit antagonistischer und/oder partiell agonistischer Aktivität, Derivate eines Proteins aus der TGF- β Superfamilie, pharmazeutische Zusammensetzungen, die die erfindungsgemäßen Muteine und/oder Derivate umfassen sowie die für die Muteine oder Derivate davon kodierenden Nukleinsäuren.

[0002] Die Protein-Familie des TGF-(transformierender Wachstumsfaktor)- β umfasst eine große Anzahl von strukturell verwandten Polypeptid-Wachstumsfaktoren, deren jeder eine faszinierende Reihe zellulärer Prozesse, einschließlich der Zellproliferation, Zellliniendetermination, Differenzierung, Mobilität, Adhäsion und Zelltod reguliert. Die Faktoren werden entsprechend komplexer zeitlicher und gewebespezifischer Muster exprimiert und spielen eine wichtige Rolle bei der Entwicklung, Homöostase und Reparatur von nahezu allen Geweben in eukaryontischen Organismen, von der Fruchtfliege bis hin zum Menschen. Insgesamt sind diese Faktoren für einen wesentlichen Teil der intrazellulären Signale verantwortlich, die das Zellschicksal bestimmen.

[0003] Eine Reihe von Arbeiten der vergangenen Jahre hat zur Aufklärung des TGF- β -Signaltransduktionsweges geführt. Die Signaltransduktion involviert Rezeptor-Serinkinasen an der Zelloberfläche, deren Substrate, die SMAD-Proteine, nach Phosphorylierung in den Kern wandern, wo sie die Transkription des Zielgenes in Zusammenarbeit mit DNA-bindenden Partnern aktivieren. Die multifunktionelle Natur von TGF- β und der weiteren zur TGF- β Superfamilie gehörenden Faktoren scheint auf dem Zusammenspiel unterschiedlicher Rezeptoren, SMAD-Proteine und DNA-bindender Proteine zu beruhen. Störungen dieses Signal-Transduktionsweges sind die Ursache verschiedener Formen menschlicher Karzinome und Entwicklungsstörungen.

[0004] Die TGF- β -Superfamilie umfasst verschiedene Subfamilien mit jeweils zwei bis 4 Mitgliedern. Eine ausführliche Übersicht über die verschiedenen Subfamilien und deren Eigenschaften ist z. B. in Massague (1998) gegeben.

[0005] Die folgende Tabelle I gibt einen Überblick über einige der wichtigsten bis heute bekannten etwa 20 Mitglieder der TGF- β Superfamilie, die als "bone morphogenetic proteins" und "growth and differentiation factors" die Neubildung und Regenerierung von Gewebe im erwachsenen Organismus steuern sowie an frühen und späten Schritten der Embryonalentwicklung wesentlich beteiligt sind.

Tabelle I

Namen	% Identität	Typische Aktivitäten	Pathophysiologie
BMP-2	100	Knochen- und Knorpel-	Ektope Knochenbildung
BMP-4	92	Entwicklung; Embryonal- Entwicklung, Apoptose	
BMP-5	61	Beitrag zur Entwicklung	Ektope Knochenbildung;
BMP-6	61	beinahe aller Organe	Psoriasis (BMP-6)
BMP-7/OP1	60		
BMP-8/OP2	55		
GDF-5/CDMP1	57	Knorpelbildung in der	
GDF-6/CDMP2	54	Gliedmaßenentwicklung	
GDF-7	57		
GDF-8/Myostatin	41	Homöostase von Skelettmuskeln	Muskeldegeneration?
TGF- β 1	35	Wachstumshemmung,	Fibrose, Narbenbildung
TGF- β 2	34	Synthese von	
TGF- β 3	36	extrazellulärer Matrix	

[0006] Obwohl die Aminosäure-Primärsequenzen der Mitglieder der TGF- β -Superfamilie, wie aus der Tabelle ersichtlich, untereinander teilweise relativ geringe Übereinstimmungen aufweisen, gibt es allen Proteinen der verschiedenen Subfamilien gemeinsame strukturelle Merkmale. So sind z. B. alle Proteine der Superfamilie Dimere, die aus zwei meist identischen Monomeren aufgebaut sind. Eine weitere Gemeinsamkeit ist der Signaltransduktionsweg: alle TGF- β -ähnlichen Proteinfaktoren signalisieren über zelluläre Rezeptoren, die aus zwei verschiedenen Typen von Serinkinase-Rezeptorketten zusammengesetzt sind. Die Typ I-Kette weist eine cytoplasmatische GS-Box und eine Serinkinase auf, die die

zellulären SMAD1- und -5-Signalproteine aktiviert. Die Typ II-Kette aktiviert eine Typ I-Rezeptor-Serinkinase durch Transphosphorylierung des GS-Box-Segmentes. Die kleinen Rezeptor-Ektodomänen der Typ I- bzw. Typ II-Ketten, jeweils 120 bis 150 Aminosäuren lang, zeigen untereinander nur eine sehr geringe Ähnlichkeit, und auch verschiedene Ketten des gleichen Typs sind relativ wenig konserviert. Ein gemeinsames Merkmal aller bekannten Rezeptorketten der TGF- β -Superfamilie sind jedoch vier konservierte Disulfidbrücken; zusätzliche Disulfidbrücken und die Positionen einiger weniger Aminosäurereste scheinen für entweder Typ I- oder Typ II-Rezeptorproteine charakteristisch zu sein.

[0007] Die Mitglieder der TGF- β -Superfamilie zerfallen jedoch hinsichtlich ihres Bindungsmechanismus in 2 Gruppen, die der TGF- β -/Aktivin-ähnlichen Proteine und die der BMP(bone-morphogenetic protein)-2-ähnlichen Proteine.

[0008] Für den Namenspatron der Superfamilie, d. h. TGF- β , ist ein geordneter sequentieller Mechanismus der Bindung an seine zellulären Rezeptoren beschrieben worden. Demnach bindet zunächst ein externer Ligand an die Typ II-Rezeptorkette und anschließend wird Typ I-Rezeptor aus der Membran in den Komplex rekrutiert. Dementsprechend stellt die Typ II-Kette den für TGF- β hochaffinen Rezeptor dar. Für die Wechselwirkung von Aktivinen mit ihren Rezeptoren scheint es einen vergleichbaren Mechanismus zu geben. Die Mitglieder der TGF- β -Superfamilie, deren Bindungsmechanismus mit dem für TGF- β beschriebenen übereinstimmt, wurden deshalb zusammenfassend als TGF- β -/Aktivin-ähnliche Proteine bezeichnet. Zu diesen werden alle Mitglieder der TGF- β -Superfamilie gerechnet, die N-terminal eine 4. Disulfidbrücke aufweisen. Dies sind nach heutigem Kenntnisstand TGF- β 1, TGF- β 2, TGF- β 3, alle Aktivine und Inhibine sowie BMP-11 und GDF-8.

[0009] Die Bindung von BMP-2 an seine zellulären Rezeptoren folgt jedoch einem Mechanismus, der sich von dem für die TGF- β -/Aktivin-ähnlichen Proteine etablierten unterscheidet. Im Gegensatz zu Situation bei TGF- β sind die Hochaffinitäts-Rezeptoren für BMP-2 die Typ I-Ketten BMPR-IA, BMPR-IB und möglicherweise auch ActR-I. Typ II-Ketten selbst können gelöstes BMP-2 zwar ebenfalls binden, jedoch mit weitaus geringerer Affinität. Daraus ist geschlossen worden, dass die Reihenfolge der Typ I- und Typ II-Rezeptor-Wechselwirkung mit BMP-2 im Vergleich zu der für TGF- β etablierten Reihenfolge umgekehrt ist. Die für die TGF- β -/Aktivin-ähnlichen Proteine gewonnenen Erkenntnisse können daher nicht auf BMP-2 und Faktoren mit ähnlichem Mechanismus, wie z. B. BMP-4, -5, -6 und -7, GDF-5, -6, -7 (BMP-2-ähnliche Faktoren) übertragen werden.

[0010] Für keinen der Typ I- oder Typ II-Rezeptoren ist bis heute ein Epitop auf dem entsprechenden Liganden lokalisiert und charakterisiert worden. Für TGF- β 1 und Aktivin A sind Mutantenproteine konstruiert und analysiert worden, die eine veränderte biologische Aktivität und Rezeptorbindungsaffinität aufweisen. Für BMP-2 sind synthetische Peptide beschrieben worden, die den Schlaufen von BMP-2 entsprechen und die die BMP-2 Aktivität inhibieren (EP 691 349).

[0011] Alle Faktoren der TGF- β Superfamilie, auch die nahe verwandten Vertreter einer Untergruppe, üben im Organismus eine eigene spezifische Funktion aus, die sich in der zell- und stadienspezifischen Expression der Gene sowie in Auswirkungen von Mutationen zeigt. Die Inaktivierung von BMP- oder GDF-Genen kann in Säugetieren zum Absterben in verschiedenen Embryonalstadien (BMP-2, BMP-4) oder in der perinatalen Periode (BMP-7) führen; des weiteren sind spezifische Änderungen der Entwicklung von Skelettelementen (GDF-5, BMP-5) beobachtet worden. Durch Überexpression der Proteine kann es zu ektopter Knochenbildung (BMP-2, BMP-4 und andere), Psoriasis (BMP-6), Neuritenneubildung (GDF-5) oder zur Regenerierung von ischämischen Nierenschäden (BMP-7) kommen. Eine Überexpression von GDF-8 (Myostatin) führt möglicherweise zu Muskelschwund. Problematisch ist auch die durch TGF- β induzierte Wucherung der extrazellulären Matrix bei Fibrose, Narbenbildung oder Zirrhose.

[0012] Um einer pathophysiologischen Wirkung der Proteine aus der TGF- β -Superfamilie vorbeugen bzw. entgegenzutreten zu können, wäre es daher überaus wünschenswert, Hemmstoffe für diese Faktoren zu entwickeln.

[0013] Aufgabe der Erfindung ist es somit, Mittel bereitzustellen, mit der die pathophysiologischen Wirkungen von Mitgliedern der TGF- β -Superfamilie vermindert werden können.

[0014] Erfindungsgemäß wird diese Aufgabe gelöst durch ein Mutein einer Kette eines Proteins aus der Superfamilie des Wachstumsfaktors TGF- β , wobei das Mutein nach Bildung eines Homodimers antagonistische und/oder partiell agonistische Aktivität aufweist, wobei das Mutein an einer oder mehreren Position(en) verändert ist, die im unveränderten Protein an einer niederaffinen Bindung an seinen Rezeptor beteiligt ist/sind.

[0015] Unter einem Antagonisten werden erfindungsgemäß Proteine verstanden, die an die Rezeptoren für die natürlichen Proteine der Super-Familie des Wachstumsfaktors TGF- β binden, mit ihrer Bindung jedoch die normalen biologischen Folgereaktionen nicht auslösen. Nach Bindung eines Antagonisten findet daher keine Signaltransduktion statt. Unter "partiell agonistischer Aktivität" wird im Zusammenhang mit der vorliegenden Erfindung eine Aktivität verstanden, die zwar in gewissem Umfang die normalen biologischen Folgereaktionen auslöst, das Ausmaß dieser Folgereaktionen jedoch weit hinter der durch den ein natürliches Protein ausgelösten Folgereaktion zurückbleibt. Unter einer partiell agonistischen Aktivität wird daher im Zusammenhang mit der vorliegenden Erfindung eine Aktivität verstanden, die weniger als 80%, bevorzugt weniger als 50% und besonders bevorzugt weniger als 25% der Aktivität des entsprechenden natürlichen Proteins aufweist. Die Aktivität kann dabei z. B. durch den C2C12-Test bestimmt werden, der nachfolgend im Kapitel "Material und Methoden" beschrieben ist.

[0016] Unter einer "niederaffinen Bindung" wird im Zusammenhang mit der BMP-2-ähnlichen Subfamilie eine Bindung verstanden, die erst bei einer Konzentration des Liganden von 10 nM oder mehr, oft sogar von mehr als 100 nM oder 1 μ M, zu einer halbmaximalen Sättigung des Rezeptorproteins führt. Im Gegensatz dazu wird unter einer "hochaffinen Bindung" eine Bindung verstanden, die bereits bei einer Konzentration des Liganden von weniger als 10 nM, oft sogar bereits von weniger als 1 nM, zu einer halbmaximalen Sättigung eines Rezeptorproteins führt. Die Sättigung in Abhängigkeit von der Ligandenkonzentration kann dabei mittels eines Biosensorsystems gemessen werden, wie es in Beispiel 4 beschrieben ist.

[0017] In Verbindung mit der Subfamilie der TGF- β /Aktivin ähnlichen Proteine ermöglicht eine "hochaffine" Bindung die Bindung des Liganden an den Rezeptortyp II auch in Abwesenheit von Rezeptortyp I, wie sich in ganzen Zellen durch chemische Quervernetzung mit radioaktiv markierten Liganden nachweisen läßt. Im Gegensatz dazu ist die "niederaffine" Bindung des Liganden an die Rezeptorkette I in Abwesenheit der Typ II Kette mit nur sehr geringer Effizienz

möglich und wird in Gegenwart der Typ II Kette verstärkt. Dies läßt sich ebenfalls durch Quervernetzung mit radioaktiv markierten Liganden überprüfen (siehe z. B. Massague; 1998; Wuytens et al., 1999).

[0018] Unter einem "unveränderten Protein" wird ein Wachstumsfaktor aus der TGF- β -Superfamilie in der Form verstanden, in der er natürlicherweise in einem Säugetier gefunden wird und biologische Aktivität ausübt. Die Angabe "an einer oder mehreren Position(en)" bedeutet, dass im Mutein ggf. nur eine einzige Aminosäure verändert ist, dass aber, z. B. wo weiterreichende Deletionen durchgeführt worden sind, auch eine größere Anzahl von Aminosäuren verändert sein kann. In bevorzugten Ausführungsformen sind zwischen 1 bis 50, besonders bevorzugt 1 bis 25 oder 1 bis 10, ganz besonders bevorzugt zwischen 1 bis 5 Aminosäuren verändert.

[0019] Erfindungsgemäß können die Muteine eine Deletion einer oder mehrerer Aminosäuren aufweisen, wobei sich die Deletion mehrerer Aminosäuren auf mehrere Positionen der Proteinkette beziehen kann. Bevorzugt sind jedoch Muteine, bei denen eine oder mehrere Aminosäuren durch andere Aminosäuren substituiert sind, wobei die mehreren Aminosäuren benachbart oder nicht benachbart sein können. Bevorzugt ist dabei eine nicht konservative Substitution, besonders bevorzugt die Substitution durch eine Aminosäure mit andersartiger Ladung oder anderer Größe. Dazu sei folgendes erläutert: Grundsätzlich werden vier physikochemische Gruppen unterschieden, in die die natürlicherweise vorkommenden Aminosäuren eingeteilt werden. Zur Gruppe der basischen Aminosäuren gehören Arginin, Lysin und Histidin. Zur Gruppe der sauren Aminosäuren gehören Glutaminsäure und Asparginsäure. Die ungeladenen/polaren Aminosäuren umfassen Glutamin, Asparagin, Serin, Threonin und Tyrosin. Die nicht polaren Aminosäuren umfassen Methionin, Phenylalanin, Tryptophan, Cystein, Glycin, Alanin, Valin und Prolin, Leucin und Isoleucin. Eine nicht konservative Substitution bedeutet in diesem Zusammenhang den Austausch einer gegebenen Aminosäure durch eine Aminosäure einer anderen physikochemischen Gruppe. Besonders bevorzugt ist der Austausch einer Aminosäure einer ersten Gruppe durch eine Aminosäure einer zweiten Gruppe, wobei die Aminosäuren der zweiten Gruppe eine andere Ladung als die Aminosäuren der ersten Gruppe aufweisen.

[0020] Bevorzugt ist außerdem der Austausch einer großen Aminosäure durch eine der kleinen Aminosäuren Glycin, Alanin oder Serin. Bevorzugt ist weiterhin der Austausch einer der kleinen Aminosäuren durch eine der großen Aminosäuren Tryptophan, Tyrosin, Phenylalanin, Leucin, Isoleucin oder Glutamin.

[0021] In einer dritten Ausführungsform werden ein oder mehrere Aminosäuren inseriert. Insertionen mehrerer Aminosäuren können an einer Position oder an mehreren Positionen der Kette auftreten.

[0022] In einer weiteren Ausführungsform werden ein oder mehrere der angegebenen Aminosäurereste chemisch modifiziert. Bei der Modifikation kann es sich z. B. um die kovalente Verbindung mit einem oder mehreren Resten handeln, die aus der folgenden Gruppe ausgewählt sind: Carbonsäuren, Amine, Polyethylenglycol, Biotin und Zucker (DeSantis et al., 1999).

[0023] In einer bevorzugten Ausführungsform ist das Mutein von einer Kette eines BMP-2-ähnlichen Proteins abgeleitet. Zur Familie der BMP-2-ähnlichen Proteine gehören die BMP-2 Subfamilie, BMP-5 Subfamilie und GDF-5 Subfamilie (s. Klassifizierung dieser Familien von Massague (1998)). Wie auch aus Tabelle I hervorgeht, weisen dabei die Mitglieder der BMP-2 Subfamilie untereinander eine Identität von 92% auf, während die Mitglieder der BMP-5 und der GDF-5 Subfamilie eine Identität von 54 bis 61%, bezogen auf BMP-2 aufweisen. Für die Angehörigen dieser drei Subfamilien wird davon ausgegangen, dass sie dem oben erwähnten Reaktionsmechanismus, der für BMP-2 nachgewiesen worden ist, folgen, d. h., dass sie im Gegensatz zu den TGF- β s oder Aktivinen zunächst mit hoher Affinität an die Typ I-Ketten BMPR-IA, BMPR-IB und möglicherweise auch ActR-I binden.

[0024] Überraschenderweise wurde nun gefunden, dass Muteine mit partiell agonistischer bzw. antagonistischer Wirkung solche Muteine sind, bei der in der von BMP-2, BMP-4, BMP-5 usw. abgeleiteten Proteinkette mindestens eine Aminosäure aus dem Bindungssepitop für den natürlichen BMP-Rezeptor II deletiert, substituiert oder modifiziert oder mindestens eine Aminosäure in das Bindungssepitop inseriert ist. Die Erfinder haben im Rahmen der vorliegenden Erfindung die Bindungssepitope für alle beteiligten Rezeptoren bestimmt. Es wurde festgestellt, dass die Aminosäure-Positionen von BMP-2, die die Bindungsaffinität für die BMPR-IA- oder BMPR-II-Rezeptorketten bestimmen, zwei einander nicht überlappende Sets bilden. In **Fig. 1** ist gezeigt, dass diese Determinanten über die gesamte BMP-2 Sequenz verteilt sind. Das räumliche Modell in **Fig. 5** zeigt, dass die funktionellen Reste zwei getrennte Epitope auf der Oberfläche des homodimeren BMP-2 Moleküls bilden.

[0025] Im ersten Epitop, das Reste aus beiden Untereinheiten umfasst, sind die Determinanten für die BMPR-IA Wechselwirkungen angeordnet. In **Fig. 5** sind die Aminosäurereste des ersten Epitops auf einer ersten Untereinheit kurz dargestellt, während die Aminosäurereste des ersten Epitops auf einer zweiten Untereinheit durch normale Buchstaben gekennzeichnet sind. Das Epitop ist hochdiskontinuierlich und umfasst Reste aus dem β 1-Faltblatt, der Schlaufe vor der Helix α 3 und die Helix α 3 von einem Monomer sowie Teile der großen ω -Schlaufe zwischen den Faltblättern β 2 und β 3 sowie das Faltblatt β 8 des anderen Monomers. Eines der Monomere trägt so die Reste V26, D30 und W31 aus dem β -Faltblatt-Bereichen β -2 und β 3 sowie die Reste K101 und Y103 aus dem β -Faltblatt-Bereich β 8 bei. Das andere Monomer trägt die Reste I62, L66, N68 und S69 aus der Helix α 3 sowie die Reste F49, P50, A52 und H54 aus dem Bereich vor der Helix α 3 bei. Auf Grund der räumlichen Struktur des Monomers wird dieses Epitop als "Wrist"-Epitop bezeichnet: Die Monomere werden mit einer offenen Hand verglichen, bei der die zentrale Helix α 3 das Handgelenk und 2 nebeneinander angeordnete β -Faltblätter die 4 Finger darstellen; die Schlaufen 1 und 2 entsprechen den Fingerspitzen jeden Fingerpaares. Das N-terminale Segment findet sich an der Position des Daumens. Folglich befindet sich das erste Epitop, das um die zentrale α -Helix angeordnet ist, am Handgelenk (Wrist). Es hat Ausmaße von ungefähr $2 \times 2,5$ bis 3 nm. Diese Ausdehnung ist mit der Funktion als hochaffiner Wechselwirkungsstelle kompatibel.

[0026] Das zweite Epitop, das auf der Handrückseite nahe den äußeren Fingersegmenten angeordnet ist, ist für die niederaffine Bindung von BMP-2 an den BMPR-II verantwortlich. Es setzt sich nur aus Aminosäureresten einer Untereinheit zusammen und wird auch als "Knuckle"-Epitop bezeichnet. Die Aminosäurereste A34 und H39 sind in den β -Faltblättern β -3 bzw. β -4 angeordnet, die Aminosäurereste S88 und L90 im Faltblatt β -7 und L100 im Faltblatt β -8. Vom Aminosäurerest F109 nehmen die Erfinder an, dass er ein weiterer für den Kontakt wichtiger Aminosäurerest ist. Das zweite Epitop scheint sehr viel kleiner als das erste Epitop zu sein, da viele Aminosäurereste an den Grenzen des zweiten

Epitops ohne sichtbare Wirkungen auf die Rezeptorbindung oder die biologische Aktivität modifiziert werden können. Es kann gegenwärtig jedoch noch nicht ausgeschlossen werden, dass das Epitop weitere funktionelle Aminosäurereste enthält.

[0027] Die beiden Epitope sind voneinander funktionell und räumlich getrennt. Von allen Bindungs determinanten wurde festgestellt, dass sie entweder für BMPR-I (Typ I) oder BMPR-II/ActR-II (Typ II) spezifisch sind. Am Fall von BMP-2 konnten antagonistische Muteine lediglich für das Knuckle-Epitop gefunden werden. Die verschiedenen Epitope sind durch Bindungs determinanten definiert und durch neutrale Reste voneinander abgegrenzt. Sie bilden nicht überlappende Bereiche auf der Oberfläche der etablierten 3-dimensionalen Struktur von BMP-2. Dennoch kann nicht ausgeschlossen werden, dass während der Typ I und Typ II Rezeptorbindung kooperative Effekte auftreten. Das Wrist-Epitop und das Knuckle-Epitop sind voneinander nur durch die Dicke eines β -Faltblatts getrennt, das die Konformation nach Bindung an die Ektodomäne ändern kann und auf diese Art und Weise kooperative Wirkungen vermitteln kann. Die räumliche Trennung der Epitope legt es weiter nahe, dass jeder der mit der Symmetrie zusammenhängenden Teile des dimeren BMP-2 Moleküls ein Paar funktionelle Epitope enthält und das zwei unabhängige Wrist-Epitope und zwei unabhängige Knuckle-Epitope insgesamt 4 Rezeptorketten binden können. Ein Komplex zwischen einem BMP-2 und zwei BMPR-IA Ektodomänen ist bereits identifiziert worden (Kirsch et al., 2000(c)).

[0028] Keines der Epitope weist jedoch die typischen Ladungsmuster auf, wie sie kürzlich für Rezeptoren diskutiert wurden (Griffith et al. 1996).

[0029] Ohne an diese Theorie gebunden sein zu wollen, wird angenommen, dass die erfindungsgemäßen BMP-2 Antagonisten höchstwahrscheinlich eine Folge des geordneten sequentiellen Bindungsmechanismus sind, der die Rezeptoraktivierung bewirkt. Dem Modell zufolge blockiert der Antagonist die hochaffine Typ I Rezeptorkette mit seinem intakten Wrist-Epitop, und das durch Substitution, Deletion, Modifikation oder Insertion veränderte Knuckle-Epitop verhindert die sich daran anschließende Oligomerisierung mit niedrig affinen Typ II Rezeptorketten. Der vergleichsweise niedrige IC_{50} der Antagonisten sowie ihre effiziente Konkurrenz mit BMP-2 um die Rezeptorbindung weisen darauf hin, dass es überwiegend die Typ I Ketten sind, die die Bindung von BMP-2 an den gesamten Rezeptorkomplex steuern, möglicherweise indem sie die Assoziationsgeschwindigkeit für BMP-2 bestimmen. Die Halbwertszeit des Komplexes zwischen BMP-2 und dem Typ I Rezeptor von mehr als 30 Minuten führt höchstwahrscheinlich dazu, dass die Bindung an den zellulären Rezeptor irreversibel ist. Eine interessante Beobachtung ist in diesem Zusammenhang die niedrige Restaktivität der hoch antagonistischen Muteine A34D und L90A im C2C12-Test, wenn man berücksichtigt, dass die Bindung an die Ektodomänen der Typ II Rezeptorketten nur ungefähr 5 bis 15-fach verringert ist. Möglicherweise ist die gleichzeitige Bindung von zwei Typ II Ketten für eine effiziente Rezeptoraktivierung notwendig, so dass eine Abnahme der Bindungsaffinität sich stärker auswirkt.

[0030] Da die anderen BMP-2-ähnlichen Proteine ihre entsprechenden Rezeptoren nach dem gleichen Mechanismus aktivieren, wie er für BMP-2 gezeigt worden ist, d. h., über ein Hochaffinitäts-Wrist-Epitop und ein Niedrigaffinitäts-Knuckle-Epitop, können auch antagonistische Muteine dieser Proteine durch Aminosäuresubstitutionen im Knuckle-Epitop erzeugt werden.

[0031] In bevorzugten Ausführungsformen werden ein oder mehrere der Aminosäurereste, die die oberflächenexponierten Bereiche aus den β -Faltblattstrukturen β -3, β -4, β -7, β -8 oder β -9 bilden, verändert. Bei diesen oberflächenexponierten Resten handelt es sich um folgende:

β -3: V33, A34

zwischen β -3 und β -4: P35, P36;

β -4: G37, Y38, H39;

nach β -4: F41, Y42;

β -6: T82, E83, L84, S85;

β -7: A86, I87, S88, L90;

β -8: K97, V98, V99, L100;

β -9: V107, E109, G110.

[0032] In einer ersten Ausführungsform werden einer oder mehrere der angegebenen Aminosäurereste einzeln oder in Gruppen von bis zu 5 Aminosäuren deletiert. Bevorzugt werden Aminosäuren deletiert, für die eine Wechselwirkung mit dem BMP-Rezeptor II belegt ist oder deren Deletion Auswirkungen auf die Konformation des "Knuckle"-Epitops hat. Durch Kombination einer Substitution mit einer Insertion und/oder Deletion oder auch durch Kombination einer Insertion mit einer Deletion lassen sich weitere Muteine herstellen, die gegebenenfalls eine verringerte Affinität für den BMP-Rezeptor II aufweisen.

[0033] Eine weitere Möglichkeit, ausgehend von der bekannten Sequenz eines Monomers für BMP-2, BMP-4, BMP-5, BMP-6, BMP-7, GDF-5, GDF-6 oder GDF-7, zu antagonistischen oder partiell agonistischen Muteinen zu kommen, besteht in der Insertion einer oder mehrerer Aminosäuren in die oberflächenexponierten Bereiche des "Knuckle"-Epitops. Prinzipiell müssen diese Aminosäuren ebenfalls den Zweck erfüllen, die Bindung an den BMP-Rezeptor II zu schwächen oder zu verhindern.

[0034] In einer bevorzugten Ausführungsform handelt es sich bei dem Mutein um eine Kette eines BMP-2-ähnlichen Proteins, wobei eine oder mehrere der folgenden Aminosäuren aus BMP-2 oder diesen entsprechenden Aminosäuren aus einem anderen BMP-2-ähnlichen Protein durch andere Aminosäuren substituiert sind:

V33, A34, P35, P36, G37, Y38, H39, F41, Y42, T82, E83, L84, S85, A86, I87, S88, L90, K97, V98, V99, L100, V107, E109 und G110.

[0035] Die folgende Tabelle II gibt einen Überblick über bevorzugte Ersatzaminosäuren für die genannten Aminosäurereste:

Tabelle II

	Aminosäurereste (BMP-2)	Ersatzamino­säuren	Bevorzugte Ersatzamino­säuren
5	V33	D, E, R, K, H, Q, N, G, A, S	D, R, Q, G
10	A34	D, E, R, K, H, Q, N, Y, F, W	D, E, R, Q, Y
	P35	D, E, R, K, H, Q, N, G, A, S	D, R, Q, G
	P36	D, E, R, K, H, Q, N, G, A, S	D, R, Q, G
15	G37	D, E, R, K, H, Q, N, Y, F, W	D, R, Q, Y
	Y38	D, E, R, K, H, Q, N, G, A, S	D, R, Q, A
20	H39	D, E, Q, N, Y, F, W, G, A, S	E, D, Q, Y, A
	F41	D, E, R, K, H, Q, N, G, A, S	E, R, Q, A
	Y42	D, E, R, K, H, Q, N, G, A, S	D, R, Q, A
25	T82	D, E, R, K, H, Q, N, Y, F, W, A	D, R, Q, Y, A
	E83	R, K, H, Q, N, Y, F, W, G, A, S	R, N, Y, G, S
30	L84	D, E, R, K, H, Q, N, G, A, S	D, R, Q, A
	S85	D, E, R, K, H, Q, N, Y, F, W	E, R, Q, Y
	A86	D, E, R, K, H, Q, N, Y, F, W	D, R, Q, G
35	I87	D, E, R, K, H, Q, N, G, A, S	D, R, Q, A
	S88	D, E, R, K, H, Q, N, Y, F, W, A, G	D, R, Q, A, G
40	L90	D, E, R, K, H, Q, N, G, A, S	D, R, Q, A
	K97	D, E, Q, N, Y, F, W, G, A, S	D, Q, Y, A
	V98	D, E, R, K, H, Q, N, G, A, S	D, R, Q, G
45	V99	D, E, R, K, H, Q, N, G, A, S	D, R, Q, G
	L100	D, E, R, K, H, Q, N, G, A, S	D, R, Q, A
50	V107	D, E, R, K, H, Q, N, G, A, S	D, R, Q, A
	E109	Y, F, W, T, Q, N, G, A, S	Y, W, Q, A
55	G110	D, E, R, K, H, Q, N, Y, F, W, A, S	D, R, Q, Y

[0036] Aus der Literatur ist bekannt, dass die verschiedenen Mitglieder der BMP-Subfamilien **2** und **5** sowie der GDF-Subfamilie **5**, auch wenn insgesamt eine relativ niedrige Homologie zwischen diesen Proteinen besteht, eine gleiche Anordnung der für die Tertiärstruktur entscheidenden Cysteine aufweisen. Dementsprechend lassen sich unter Berücksichtigung dieser konservierten Positionen die einer bestimmten Aminosäure in BMP-2 entsprechenden Aminosäurepositionen bei den anderen Mitgliedern der genannten Subfamilien bestimmen. So entspricht beispielsweise die BMP-2-Position V33 in BMP-7 einem Isoleucin, A34 ist ebenfalls Alanin, P35 ein Prolin, P36 ein Glutamat, H39 ein Alanin, S88 ein Serin, L90 ein Leucin, V98 ein Valin, L100 ein Leucin und E109 ein Arginin. **Fig. 6** zeigt eine mit dem Programm "Multalin" durchgeführtes Alignment der Sequenzen von BMP-2, BMP-4, BMP-5, BMP-6, BMP-7, BMP-8, GDF-5, GDF-6, GDF-7, GDF-3, GDF-1, BMP-10, GDF-2, BMP-15, GDF-9B, GDF-9, BMP-3, GDF-10, Act-A, Act-B, Act-C, BMP-11, GDF-8, TGF- β 1, TGF- β 2, TGF- β 3, Inh-a, MIS und GDNF, aus dem die einer bestimmten BMP-2 Aminosäure entsprechenden Aminosäuren in anderen Mitgliedern der TGF- β -Superfamilie entnommen werden können. Die Positionen, die durch den Vergleich mit BMP-2 ermittelt werden, können ebenfalls durch Substitution, Deletion oder chemische Modi-

fikation verändert werden. Desgleichen können die Epitope durch Insertion Bindungsaffinität einbüßen, wobei Insertionen jeweils unmittelbar vor oder nach den angegebenen Positionen bevorzugt sind.

[0037] Die Veränderung der für BMP-2 genannten Positionen in Mitgliedern der Subfamilien BMP-5 und GDF-5 durch eine nicht konservative Substitution, Deletion oder chemische Modifikation führt jeweils zu Muteinen mit veränderten, und zwar in der Regel verminderten Bindungseigenschaften für BMPR-II oder für einen anderen Typ II Rezeptor. 5

[0038] Die Erfindung bezieht sich weiterhin auf Muteine, die mindestens 50% Identität auf der Aminosäureebene mit einem Wachstumsfaktor aus der TGF- β -Superfamilie und außerdem antagonistische und/oder partiell agonistische Aktivität aufweisen. Somit sind auch Muteine umfasst, deren Aminosäuresequenz sich von der Aminosäuresequenz der entsprechenden natürlichen Proteinketten auch in Bereichen, die für eine antagonistische bzw. partiell agonistische Aktivität nicht entscheidend sind, unterscheidet. 10

[0039] Der dem Fachmann bekannte Ausdruck "Identität" bezeichnet den Grad der Verwandtschaft zwischen zwei oder mehr DNA-Molekülen bzw. zwei oder mehr Polypeptid-Molekülen, der durch die Übereinstimmung zwischen den Sequenzen bestimmt wird. Der Prozentsatz der "Identität" ergibt sich aus dem Prozentsatz identischer Bereiche in zwei oder mehr Sequenzen unter Berücksichtigung von Lücken oder anderen Sequenzbesonderheiten.

[0040] Die Identität miteinander verwandter Polypeptide oder DNA-Moleküle kann mit Hilfe bekannter Verfahren bestimmt werden. In der Regel werden spezielle Computerprogramme mit den besonderen Anforderungen Rechnung tragenden Algorithmen eingesetzt. Bevorzugte Verfahren zur Bestimmung der Identität erzeugen zunächst die größte Übereinstimmung zwischen den untersuchten Sequenzen. Computerprogramme zur Bestimmung der Identität zwischen zwei Sequenzen umfassen, sind jedoch nicht eingeschränkt auf, das GCG-Programmpaket, einschließlich GAP (Devereux, J., et al., *Nucleic Acids Research* **12** (12): 387 (1984); Genetics Computer Group University of Wisconsin, Madison, (WI)); BLASTP, BLASTN und FASTA (Altschul, S. et al., *J. Molec Biol* **215**: 403/410 (1990)). Das BLAST X Programm kann vom National Centre for Biotechnology Information (NCBI) und aus weiteren Quellen bezogen werden (BLAST Handbuch, Altschul S., et al., NCB NLM NIH Bethesda MD 20894; Altschul, S., et al., *J. Mol.* **215**: 403/410 (1990)). Auch der bekannte Smith Waterman-Algorithmus kann zur Bestimmung von Identität verwendet werden. 15 20

[0041] Bevorzugte Parameter für den Sequenzvergleich umfassen die nachstehenden: 25

Algorithmus: Needleman und Wunsch, *J. Mol. Biol* **48**: 443–453 (1970)

Vergleichsmatrix: BLOSUM62 aus Henikoff & Henikoff, *PNAS USA* **89** (1992), 10915–10919

Lückenwert (Gap Penalty): 12

Lückenlängen-Wert

(Gap Length Penalty): 2 30

[0042] Das GAP-Programm ist auch zur Verwendung mit den vorstehenden Parametern geeignet. Die vorstehenden Parameter sind die Standardparameter (default parameters) für Aminosäuresequenz-Vergleiche, wobei Lücken an den Enden den Homologiewert nicht verringern. Bei sehr kleinen Sequenzen im Vergleich zur Referenzsequenz kann es weiterhin notwendig sein, den Erwartungswert auf bis zu 100000 zu erhöhen und ggf. die Wortlänge (wordsize) auf bis zu 2 zu verkleinern. 35

[0043] Weitere beispielhafte Algorithmen, Lücken-Öffnungs-Werte (gap opening penalties), Lückenausdehnungs-Werte (gap extension penalties), Vergleichsmatrizen einschließlich der im Programm-Handbuch, Wisconsin-Paket, Version 9, September 1997, genannten können verwendet werden. Die Auswahl wird von dem durchzuführenden Vergleich abhängen und weiterhin davon, ob der Vergleich zwischen Sequenzpaaren, wobei GAP oder Best Fit bevorzugt sind, oder zwischen einer Sequenz und einer umfangreichen Sequenz-Datenbank, wobei FASTA oder BLAST bevorzugt sind, durchgeführt wird. 40

[0044] Eine mit den oben genannten Algorithmen ermittelten Übereinstimmung von 50% wird als 50% Identität bezeichnet. Entsprechendes gilt für höhere Identitätsgrade.

[0045] In bevorzugten Ausführungsformen haben die erfindungsgemäßen Muteine eine Identität von 60% oder mehr, z. B. mehr als 70% oder 80%, mit der Sequenz einer Kette aus reifem humanen BMP-2-ähnlichen Protein. Die Sequenz für reifes humanes BMP-2 findet sich z. B. in Celeste et al. (1990). Noch weiter bevorzugt sind Muteine mit mehr als 90, 95 oder 97% Identität. 45

[0046] Wie oben erwähnt, ist im Fall von BMP-2 das Epitop, das eine niederaffine Bindung eingeht, das "Knuckle"-Epitop, während das Epitop, das eine hochaffine Bindung mit dem Rezeptor eingeht, das "Wrist"-Epitop ist. Die erfindungsgemäßen Muteine können weiterhin von einem Protein der TGF- β -Aktivin-Familie abgeleitet sein. In diesem Fall handelt es sich jedoch überraschenderweise gezeigt, dass nicht Veränderungen im "Knuckle"-Epitop, sondern Veränderungen im "Wrist"-Epitop zu Muteinen mit antagonistischer und/oder partiell agonistischer Aktivität führen. Dementsprechend ist in erfindungsgemäßen Muteinen, die von einem Protein der TGF- β -Aktivin-Familie abgeleitet sind, ein oder mehrere Aminosäuren aus dem "Wrist"-Epitop verändert. 50

[0047] Zur TGF- β -Aktivin-Familie gehören TGF- β 1, TGF- β 2, TGF- β 3, alle Aktivine, Inhibine, BMP-11 und GDF-8. Bisher bekannte Aktivine umfassen beispielsweise Aktivin β A, Aktivin β B, Aktivin β C und Aktivin β E. Zu den Inhibinen zählen nach heutigem Kenntnisstand die Inhibine β A, β B und β C. 55

[0048] Auch im Fall der von der TGF- β -Aktivin-Familie abgeleiteten Muteine sind Antagonisten oder partielle Agonisten in erster Linie durch Veränderung von Aminosäuren in den oberflächenexponierten Bereichen, d. h. denjenigen Bereichen, die an der Bindung an den Rezeptor beteiligt sind, erhältlich. Dabei handelt es sich im wesentlichen um die Helix vor der Faltblattstruktur β 1, die Faltblattstruktur β 1, die lange Schleife zwischen den Faltblattstrukturen β 2 und β 3, die Schlaufe vor der Helix α 3, die Helix α 3 sowie die Faltblattstruktur β 8. Wie zuvor für die BMP-2-ähnlichen Proteine beschrieben, können solche Veränderungen durch Deletionen, Substitutionen oder Modifikationen herbeigeführt werden, sowie durch die Insertion einer oder mehrerer Aminosäuren. Die oben im Zusammenhang mit dem BMP-2-ähnlichen Proteinen gegebenen Möglichkeiten sind hier entsprechend realisierbar. 60

[0049] In bevorzugten Ausführungsformen wird mindestens eine der folgenden Aminosäuren verändert, d. h. deletiert, substituiert und/oder modifiziert und/oder ein oder mehrere Aminosäuren inseriert, wobei sich die Positionsangaben auf BMP-2 beziehen: 65

K5, S13, V26, G27, W28, N29, D30, W31, P48, F49, P50, A52, D53, H54, N59, I62, V63, I66, N68, S69, V70, K101, Y103.

[0050] Wie der Fig. 6 entnommen werden kann, entsprechen diese Positionsangaben im TGF- β -1:

Y6, N14, L28, G29, W30, K31, fehlt, W32, P49, Y50, I51, S53, fehlt, Q57, K60, V61, L64, N66, Q67, H68, E99, L101.

[0051] Die 3-dimensionale Struktur des Komplexes zwischen BMP-2 und den Typ I Rezeptor BMPR-IA (Kirsch, et al.; 2000 (c)) zeigt, dass diese Reste wesentlich am Rezeptorkontakt beteiligt sind.

[0052] Die erfindungsgemäßen Muteine können auch dann, wenn sie von TGF- β -Aktivin-ähnlichen Wachstumsfaktoren abgeleitet sind, zusätzlich in den für die Bindung an den Rezeptor nicht essentiellen Regionen verändert sein. Muteine mit einer Identität von mindestens 50% mit einer Kette eines TGF- β -Aktivin-ähnlichen Wachstumsfaktors mit einer antagonistischen und/oder partiell agonistischen Aktivität sind ebenfalls umfasst. Solche Muteine können z. B. auch aus anderen Säugern stammen, beispielsweise Maus, Ratte, Kaninchen, Meerschweinchen, Rind, Schwein oder Schaf. Solange solche Muteine im C2C12 Zelltest eine antagonistische und/oder partiell agonistische Aktivität aufweisen, sind sie ebenfalls Gegenstand der Erfindung. Bevorzugt sind Muteine mit einer Identität von 60% oder mehr, z. B. mehr als 70% oder 80% Identität mit einer Kette eines Muteins aus der TGF- β -Aktivinfamilie. Noch mehr bevorzugt sind Muteine mit mehr als 90, 95 oder 97% Identität.

[0053] In einer weiteren Ausführungsform ist vorgesehen, erfindungsgemäße Muteine durch größere Veränderungen der zugrundeliegenden Moleküle zu erzeugen, z. B. indem neben einer Substitution eine Insertion eingeführt wird. Denkbare Muteine beider Subfamilien der TGF- β Superfamilie enthalten auch zusätzlich zu einer Deletion eine Insertion, oder zusätzlich zu einer Substitution eine Deletion, oder mindestens eine Substitution, Deletion oder Insertion in Verbindung mit einer chemischen Modifikation. Selbstverständlich können auch 2 Veränderungen eines Typs, z. B. eine Substitution an zwei verschiedenen Stellen, allein oder in Kombination mit Veränderung eines zweiten Typs, z. B. einer Insertion an einer anderen Stelle, auftreten. Ebenso können mehr als 2 Typen von Veränderungen kombiniert werden, also z. B. kann neben einer Substitution sowohl eine Deletion an einer Stelle als auch eine Insertion an einer anderen Stelle vorliegen.

[0054] Der Fachmann weiß, wie er die Muteine herzustellen hat. Neben einer herkömmlichen Proteinsynthese, z. B. der Merrifield-Synthese, bieten sich für die Substitution, Deletion und Insertion vor allem rekombinante Verfahren an. Auf der Grundlage der bekannten Gene können gezielt Mutationen eingefügt werden, z. B. durch die oligonukleotidabhängige stellenspezifische Mutagenese. Es können Fragmente deletiert oder eingesetzt werden. Alternativ können für die Muteine kodierende DNA-Sequenzen de novo synthetisiert werden.

[0055] Chemische Modifikationen werden ebenfalls in dem Fachmann bekannter Weise eingeführt. Die Durchführung chemischer Modifikationen an Proteinketten ist z. B. beschrieben in DeSantis & Jones (1999).

[0056] In weiteren bevorzugten Ausführungsformen ist das zuvor beschriebene Mutein mit einem zielspezifischen Molekül kovalent verbunden. Dies kann z. B. ein Heparinbindendes Epitop sein, das eine verstärkte Bindung an die Glycosaminoglycane der extrazellulären Matrix oder der Zelloberfläche bewirkt (s. z. B. PCT/EP00/00637). Unter der Maßgabe, dass dieses zielspezifische Molekül ein Antikörper ist, kann so z. B. gezielt die Signaltransduktion in solchen Zellen unterbunden werden, die ein Oberflächenprotein aufweisen, das von dem Antikörper erkannt wird. Zielspezifität kann dem Mutein jedoch nicht nur durch kovalente Bindung an einen Antikörper verliehen werden, sondern gegebenenfalls ebenso durch kovalente Bindung an einen Liganden, der für einen nur auf der Zielzelle vorkommenden Rezeptor spezifisch ist.

[0057] In bevorzugten Ausführungsformen werden Muteine mit kovalent daran gebundenem zielspezifischen Molekül durch rekombinante Expression eines Fusionsproteins, das gegebenenfalls einen Spacer zwischen Mutein-kodierender Sequenz und zielspezifischen Molekül enthält, hergestellt.

[0058] Die Erfindung bezieht sich weiterhin auf Derivate von Proteinen aus der TGF- β Superfamilie, die als essentiellen Bestandteil ein Mutein gemäß der vorliegenden Erfindung sowie zur Bildung eines Dimers eine weitere Kette eines Proteins aus der Gruppe der TGF- β Superfamilie oder ein weiteres erfindungsgemäßes Mutein enthalten. Die Derivate können daher sowohl Homodimere als auch Heterodimere aus erfindungsgemäßen Muteinen bilden. Darüber hinaus kann ein Derivat ein Mutein und eine natürliche Kette eines Proteins aus der TGF- β -Super-Familie umfassen.

[0059] Die Erfindung bezieht sich weiterhin auf pharmazeutische Zusammensetzungen, die mindestens ein erfindungsgemäßes Protein und/oder ein erfindungsgemäßes Derivat enthalten. Umfasst von der Erfindung sind weiterhin pharmazeutisch verträgliche Salze davon. Die pharmazeutischen Zusammensetzungen können in Abhängigkeit von der Natur des darin enthaltenden Muteins und in Abhängigkeit von dem zu behandelnden pathologischen Zustand in Form von Salben, Cremes, Lotionen für die topische Applikation vorgesehen sein, in Form von Lösungen oder Lyophilisaten für intramuskuläre oder subkutane Injektionen. Die Formulierung und Konfektionierung der pharmazeutischen Zusammensetzungen erfolgt dabei nach Stand der Technik bekannten Maßgaben und umfasst u. a. die Stabilisierung.

[0060] Gemäß einer weiteren Ausführungsform ist die Verwendung eines erfindungsgemäßen Muteins und/oder eines erfindungsgemäßen Derivates zum Herstellen pharmazeutischer Zusammensetzungen beansprucht. Diese können zur Prophylaxe und/oder zur Behandlung von Erkrankungen eingesetzt werden, die durch ein Protein aus der Superfamilie des TGF- β -Wachstumsfaktors vermittelt werden. Beispiele solcher Erkrankungen sind ektope Knochenbildungen, Psoriasis und Muskelschwund, Narbenbildung, Fibrosen und Zirrhosen. Dabei wird im Fall von ektope Knochenbildung bevorzugt ein Mutein einer der Wachstumsfaktoren BMP-2 oder BMP-4 eingesetzt, während z. B. im Fall von Leberzirrhose bevorzugt ein Mutein eines oder mehrerer der Wachstumsfaktoren TGF- β 1, - β 2 oder - β 3 bzw. ein diese enthaltendes Derivat verwendet wird.

[0061] In weiteren Ausführungsformen der vorliegenden Erfindung werden Antikörper gegen ein erfindungsgemäßes Mutein oder ein erfindungsgemäßes Derivat bereitgestellt. Da die Muteine sich durch eine Veränderung an oberflächenexponierten Bereichen des Moleküls auszeichnen, wirkt sich dies auch auf die spezifisch mit dem Molekül reagierenden Antikörperpopulationen aus. Antikörper können auf herkömmliche Art und Weise entweder durch Immunisieren von Tieren (z. B. Kaninchen, Mäusen oder Ratten) zur Herstellung polyklonaler Antikörper bzw. durch Immunisieren und nachfolgendes Immortalisieren von Antikörper produzierenden Zellen um Fall von monoklonalen Antikörpern herge-

stellt werden. Die dafür erforderlichen Verfahren sind dem Fachmann mittlerweile bestens vertraut, jedoch muß wegen der hohen phylogenetischen Invarianz der Superfamilie darauf geachtet werden, für die Antikörpererzeugung möglichst einen Wirt zu wählen, dessen Wachstumsfaktoren sich von dem, gegen den Antikörper erzeugt werden sollen, weitgehend unterscheiden.

[0062] Die Erfindung betrifft weiterhin die für die erfindungsgemäßen Muteine kodierenden Nukleinsäuren. Diese enthalten eine Nukleinsäuresequenz, die für ein gewünschtes Mutein kodiert. Die Nukleinsäuresequenz für BMP-2 ist z. B. aus Wozney et al. (1988) bekannt, die für TGF- β 2 aus Madisen et al. (1988). Die für ein Mutein kodierende Nukleinsäuresequenz unterscheidet sich davon primär durch die für die veränderten Aminosäuren kodierenden Triplets, d. h. durch das Fehlen, den Austausch oder die Insertion von einem oder mehreren Codons. Soweit das Mutein ein Mutein mit einer Identität von 50% oder mehr auf Aminosäureebene ist, haben die entsprechenden für eine natürliche reife Proteinkette verminderte Identität. Von dieser wegen der Degeneration des genetischen Codes abweichende Nukleinsäuren sind ebenfalls umfasst. Weiterhin sind zu den für die Muteine kodierenden Nukleinsäuresequenzen komplementäre Sequenzen sowie mit diesen komplementären Sequenzen unter stringenten Bedingungen hybridisierende Nukleinsäuren, die für ein Mutein kodieren, das nach Bildung eines Homodimers antagonistisch oder partiell agonistische BMP-2 Aktivität aufweist, umfasst. Stringente Bedingungen sind dabei beispielsweise eine Hybridisierung bei 68°C in 0,5 \times SSC. Diese und weitere stringente Hybridisierungsbedingungen können im Handbuch von Maniatis et al., 1989, nachgesehen werden.

[0063] Die erfindungsgemäße Nukleinsäure kann eine genomische DNA, eine cDNA, eine synthetische DNA oder eine RNA sein. Genomische DNAs oder cDNAs können nach im Stand der Technik bekannten Verfahren aus den entsprechenden gDNA- oder cDNA-Banken isoliert werden. Bei der Isolierung von Nukleinsäuren aus cDNA-Banken sind gewebe- oder zelllinienspezifische Banken, z. B. aus U-2 OS-Osteosarkom-Banken oder Prostata-Adenocarcinoma-Banken, bevorzugt. Synthetische DNA kann nach bekannten Verfahren hergestellt werden, RNA entweder mittels RNA-Vektoren oder aus mRNA isoliert werden. Für die rekombinante Produktion von erfindungsgemäßen Muteinen wird man je nach Expressionssystem eine genomische DNA oder cDNA bevorzugen, wobei jedoch die Expression mittels RNA-Vektoren nicht ausgeschlossen ist.

[0064] Im Fall von Substitutionsveränderungen kann durch im Stand der Technik bekannte Verfahren das für die ursprüngliche Aminosäure kodierende Codon ersetzt werden. Im Fall von Deletionen werden für ein oder mehrere Aminosäure kodierende Codons entfernt, während im Fall von Insertionen Codontriplets, die für die gewünschten Aminosäuren kodieren, eingesetzt werden. Bei der Auswahl von Codons im Falle einer Substitution oder Insertion wird sich der Fachmann bemühen, dem Codongebrauch des vorgesehenen Wirtsorganismus Rechnung zu tragen. Die entsprechenden Informationen sind im Stand der Technik erhältlich.

[0065] Erfindungsgemäß werden weiterhin Nukleinsäuren zur Verfügung gestellt, die einen zur Expressionskontrolle geeigneten Promotor enthalten, wobei die für ein erfindungsgemäßes Mutein kodierende Nukleinsäuresequenz unter der Kontrolle dieses Promotors steht. Die Wahl eines geeigneten Promotors ist wiederum von der Wahl des Expressionssystems abhängig. Der Fachmann hat hierbei die Wahl zwischen einer Vielzahl bekannter, induzierbarer oder konstitutiver Promotoren für die verschiedensten Wirtsorganismen.

[0066] Zur rekombinanten Expression der erfindungsgemäßen Nukleinsäure wird diese bevorzugt in einen Vektor eingesetzt. Die Erfindung betrifft weiterhin einen Vektor, der eine erfindungsgemäße Nukleinsäure enthält, sowie Wirtsorganismen, die eine Nukleinsäuresequenz, die für ein Mutein kodiert, entweder direkt in das Genom integriert oder aber in Form eines autonom replizierenden Vektors enthält. Im Stand der Technik sind zahlreiche prokaryontische und eukaryontische Expressionssysteme bekannt, wobei die Wirtszellen beispielsweise ausgewählt sind aus prokaryontischen Zellen, z. B. Bakterien wie E. coli oder B. subtilis, aus eukaryontischen Zellen, wie Hefezellen, Pflanzenzellen, Insektenzellen und Säugerzellen, z. B. CHO-Zellen, COS-Zellen oder HeLa-Zellen, sowie Derivaten davon. Im Stand der Technik sind beispielsweise bestimmte CHO-Produktionslinien bekannt, deren Glykosylierungsmuster im Vergleich zu CHO-Zellen verändert sind. Die durch die Verwendung glykosylierungseffizienter oder glykosylierungsverringert Wirtszellen erhaltenen Polypeptide verfügen über eine veränderte räumliche Struktur, die möglicherweise mit einer veränderten biologischen Aktivität einhergeht.

[0067] Die Erfindung betrifft außerdem ein Verfahren zum Herstellen eines erfindungsgemäßen Muteines, wobei das Verfahren die Kultivierung einer Wirtszelle unter der zur Expression geeigneten Bedingungen und ggf. das Aufreinigen des exprimierten Muteins nach im Stand der Technik bekannten Verfahren umfasst.

[0068] Die folgenden Beispiele und die Figuren erläutern die Erfindung, ohne sie darauf einzuschränken.

Figurenbeschreibungen

Fig. 1

[0069] **Fig. 1** zeigt die Sequenzen für BMP-2, BMP-7, TGF- β 2 und TGF- β 3, wobei entsprechende Aminosäuren untereinander angeordnet sind. Über der BMP-2 Sequenz sind die durch Substitution veränderten Aminosäurereste angegeben. BMP-2 Muteine mit verringerter Bindungsaffinität für den Typ II Rezeptor BMPR-II sind in durch einen doppelten vertikalen Strich kenntlich gemacht. Veränderte Bindungsaffinitäten für den Typ I Rezeptor BMPR-IA, die auf einer erniedrigten Assoziations- oder einer erhöhten Dissoziationsgeschwindigkeitskonstante beruhen, sind mit einem Plus (+) bzw. Kreuz (x) an den entsprechenden Positionen gekennzeichnet. Einfache vertikale Striche weisen darauf hin, dass keine meßbaren Änderungen der Funktion der entsprechenden Muteine gefunden werden konnten. Die Nummerierung bezieht sich auf die BMP-2 Sequenz.

Fig. 2

[0070] **Fig. 2** gibt Aufschluß über die biologische Aktivität und die inhibitorischen Eigenschaften von BMP-2 Muteinen.

(A) Nach Inkubation von BMP-2 oder einem BMP-2 Mutein (250 nM) wurde die alkalische Phosphataseaktivität gemessen. Die von jedem Mutein hervorgerufene Antwort wurde in % der BMP-2 Antwort ausgedrückt. Die Werte stellen die Mittelwerte (+/- Standardabweichung) von 4 Messungen dar.

5 Muteine mit gefüllten Symbolen sind hinsichtlich ihrer BMPR-II Wechselwirkung verändert, wie in **Fig. 4** gezeigt. Plus- oder Kreuz-Symbole weisen auf Muteine mit einer veränderten Assoziations- oder Dissoziationskonstante für die Bindung an die BMPR-IA Rezeptorkette hin.

(B) Die dosisabhängige Induktion der Aktivität der alkalischen Phosphatase in ausgehungerten C2C12 Zellen ist für BMP-2 (○) und für die BMP-2 Muteine A34D (◊), D30K (◻) und P50A (Δ) gezeigt. Die Hintergrundabsorption bei 405 nm von 0,080 +/- 0,020 wurde nicht abgezogen, um das Signal/Hintergrundverhältnis darzustellen.

10 (C) Die Inhibition der Induktion der alkalischen Phosphataseaktivität in ausgehungerten C2C12 Zellen wurde nach Inkubation mit 250 nM BMP-2 Mutein in Gegenwart von 10 nM (○) oder 20 nM (Δ) BMP-2 bestimmt. Die in Gegenwart von BMP-2 allein erhaltene Antwort ist durch eine gepunktete Linie angezeigt und wurde als 100% angesetzt. Die Werte stellen einen Mittelwert +/- Standardabweichung von 4 Messungen dar.

15 Muteine mit gefüllten Symbolen sind hinsichtlich ihrer BMPR-II Wechselwirkung verändert. Plus- oder Kreuz-Symbole weisen auf Muteine mit veränderten Assoziations- oder Dissoziationskonstanten für die Bindung an den BMPR-IA Rezeptor hin.

20 (D) Die Inhibition der BMP-2 Aktivität (10 nM BMP-2) durch zunehmende Dosen möglicherweise antagonistischer (partiell agonistischer) BMP-2 Muteine in ausgehungerten C2C12 Zellen. Die Dosiswirkungskurven der Muteine A34D (○) H39D (◻) S88A (Δ), I.90A (▽) und I.100A (◊) in Gegenwart von 10 nM BMP-2 wurden nach Inkubation der Zellen (3 Tage) und Analyse der induzierten alkalischen Phosphataseaktivität erhalten.

Fig. 3

25 **[0071]** **Fig. 3** zeigt die Biosensoranalyse der Bindung von BMP-2 und BMP-2 Muteinen an (A) Typ I oder (B) Typ II BMP-Rezeptorketten.

Fig. 4

30 **[0072]** **Fig. 4** zeigt die Wechselwirkung von BMP-2 Muteinen mit Typ I (BMPR-IA)- oder Typ II (BMPR-II, ActR-II)-Rezeptorektodomänen.

[0073] Die Geschwindigkeitskonstanten für die Assoziation (k_{on}) und Dissoziation (k_{off}) eines BMP-2 Muteins bei einer Konzentration von 15, 30 und 45 nM mit immobilisierter BMPR-IA Rezeptorektodomäne wurde aus den in **Fig. 3(A)** gezeigten Sensogrammen abgeleitet. Die in **Fig. 3(B)** gezeigten Sensogramme wurden ausgewertet, um die Gleichgewichtsbindung von 45 nM Mutein (EQ45) an immobilisierte BMPR-II- oder ActR-II-Rezeptorektodomänen abzuleiten.

35 Alle Werte wurden normalisiert, in dem die k_{on} , k_{off} und EQ45 Werte von BMP-2 als Standard genommen wurden.

(A) Gleichgewichtsbindung von zunehmenden Konzentrationen von BMP-2 an die Typ I Rezeptoren BMPR-IA und BMPR-IB sowie an die Typ II Rezeptoren BMPR-II und ActR-II. Für die Bestimmung der Gleichgewichtsbindung an die immobilisierten Rezeptordomänen wurden die in **Fig. 3** gezeigten Sensogramme ausgewertet.

40 (B) Differentielle Bindungsaffinität von BMP-2 Muteinen an BMPR-II oder ActR-II Rezeptoren. Die Gleichgewichtsbindung während der Biosensoranalyse von 45 nM Mutein (EQ45) an BMPR-II ist gegen die Bindung an ActR-II aufgetragen. Die Werte sind durch die Gleichgewichtsbindung von BMP-2 an die entsprechenden Rezeptoren normalisiert.

45 (C) Graphische Darstellung der Geschwindigkeitskonstanten für die Assoziation (k_{on}) und Dissoziation (k_{off}) eines BMP-2 Muteins mit dem BMPR-IA Rezeptor. Muteine, die spezifisch hinsichtlich ihrer k_{on} verändert sind, sind durch Plus-Symbole gekennzeichnet, solche mit spezifisch veränderter k_{off} durch Kreuz-Symbole.

(D) Graphische Darstellung der Assoziationskonstanten (k_{on}) für die BMPR-IA Bindung und die Gleichgewichtsbindung (EQ45) an BMPR-II für die gleichen Muteine wie in (C). Weil sowohl die Assoziationskonstanten als auch die Gleichgewichtsbindung von der Konzentration des BMP-2 Muteins abhängen, werden spezifische (und konzentrationsunabhängige) Veränderungen sichtbar. Muteine mit einer spezifischen Abnahme des Bindungsgleichgewichts sind durch gefüllte Kreise markiert.

Fig. 5

55 **[0074]** **Fig. 5** ist ein Raummodell von BMP-2 (Scheufler et al., 1999), in dem die die Typ-I Rezeptorbindung bestimmenden Reste des "wrist"-Epitops und die die Typ-II Rezeptorbindung bestimmenden Reste des "knuckle"-Epitops bezeichnet sind. Die Zuordnung ergibt sich aus **Fig. 1**, sowie aus den Tabellen und Auflistungen auf den Seiten 12/13 und 17. Reste der einen Untereinheit sind dick und kursiv beschriftet, Reste der anderen mit einfachen Großbuchstaben.

60 **[0075]** Auf der kleinen inserierten Schemazeichnung ist das dimere Protein in der Papierebene um die lange Achse um 90 Grad gedreht.

Fig. 6

[0076] Sequenzzuordnung von Faktoren der TGF- β Superfamilie. Die Nummerierung folgt der Aminosäure-Sequenz des reifen humanen BMP-2.

[0077] Eine extrazelluläre Domäne des humanen BMPR-IA, umfassend die Reste **24-142** (ten Dijke et al., 1993) einschließlich einer N-terminalen Verlängerung (GSGAMA) wurde als lösliches Thioredoxin-Fusionsprotein in *E. coli* exprimiert. Nach Thrombinspaltung wurde das Protein mittels Affinitätschromatographie über BMP-2 Sepharose gereinigt, wie von Kirsch et al., (2000 (a)) beschrieben.

10

[0078] Die extrazellulären Domänen von ActR-II (Aminosäurereste 19-126) (Matzuk und Bradley, 1992), BMPR-II (Aminosäurereste 27-151) (Rosenzweig et al., 1995) und BMPR-IB (Aminosäurereste 14-126) (Astrom et al., 1999) wurden mit einer C-terminalen Thrombinspaltstelle (TVPRGS) zusammen mit einem 6 × His-tag in SF-9 Insektenzellen Pharmingen im Einklang mit den Instruktionen des Herstellers exprimiert. Die korrespondierenden DNA-Sequenzen wurden in die BamHI-Spaltstelle des Baculovirus Transfervektors pAcGP67B (Pharmingen) inseriert. Das Kulturmedium, das nach Infektion der SF9-Zellen mit einer MOI (multiplicity of infection) von 3 vier Tage lange inkubiert worden war, wurde auf Ni-NTA-Agarose Qiagen in einem Waschpuffer (50 mM NaH₂PO₄, pH 8,3, 300 mM NaCl, 10 mM Imidazol) bei 4°C aufgetragen. Die rekombinanten Proteine wurden mit Elutionspuffer (50 mM NaH₂PO₄, pH 8,3, 300 mM NaCl, 300 mM Imidazol) eluiert und gründlich gegen Hochsalz HBS-Puffer (10 mM HEPES, pH 7,4, 500 mM NaCl, 3,4 mM EDTA) dialysiert. Schließlich wurden die Ektodomänen an eine BMP-2-Sepharose-Affinitätsmatrix adsorbiert (Kirsch et al., 2000(a)) gewaschen und mit 4 M MgCl₂ eluiert. Die gereinigten Proteine wurden in Niedrigsalz HBS-Puffer (10 mM HEPES, pH 7,4, 150 mM NaCl, 3,4 mM EDTA) überführt, mittels YM **10** Ultrafiltrationsmembranen konzentriert und bei -80°C gelagert.

15

20

[0079] Die gereinigten Rezeptorproteine wurden durch Inkubation mit äquimolaren Konzentrationen von Sulfo-NHS-LC-Biotin (Pierce) wie beschrieben N-biotinyliert (Shen et al., 1996).

25

Herstellung von BMP-2-Muteinen

[0080] Eine BMP-2 cDNA, die für die Reste 283-396 des reifen BMP-2-Proteins plus der beiden N-terminalen Aminosäuren MA kodiert (Ruppert et al., 1996), wurde einer in vitro Kassetten-Mutagenese (Wang et al., 1997) unterworfen, wofür synthetische doppelsträngige Oligonukleotide verwendet wurden. Die BMP-2-Muteine wurden in *E. coli* exprimiert, als Einschlusskörper isoliert, renaturiert und wie in Ruppert et al., s. o., beschrieben, gereinigt.

30

C2C12[alkalischer Phosphatase(ALP)]-Test

35

[0081] Die Promyoblastenzellen C2C12 (ATCC CRL-1772, Blau et al., 1983) wurden in einer Dichte von 3×10^4 Zellen pro Napf in einer Mikrotiterplatte mit 96 Näpfen **3** Tage lang mit 1 bis 250 nM jeder BMP-2-Variante in 100 µl DMEM-Medium mit 2% Kälberserum und Antibiotika (100 U/ml Penicillin G und 100 µg/ml Streptomycin) bei 37°C in angefeuchteter Atmosphäre bei 5% CO₂ stimuliert. Die Zellen wurden mit PBS gewaschen und dann 1 Stunde mit 100 µl 1% NP40 in ALP-Puffer (0,1 M Glycin, pH 9,6, 1 mM MgCl₂, 1 mM ZnCl₂) lysiert. Die ALP-Aktivität wurde bestimmt, indem die lysierten Zellen 15 Minuten mit 100 µl ALP-Puffer plus 1 mg/ml p-Nitrophenylphosphat inkubiert wurden und die Extinktion bei 405 nm gemessen wurde. Eine A₄₀₅-Extinktionseinheit entspricht 1,5 nmol p-Nitrophenolatproduktion pro Minute pro 3×10^4 Zellen. Die Ergebnisse wurden als Mittelwerte, die in vier unabhängigen Experimenten gewonnen worden waren, mit einer Standardabweichung (SD) von +/-39% ausgedrückt. Inhibitionsexperimente, die in Gegenwart von 10 oder 20 nM BMP-2 durchgeführt worden waren, zeigten größere Standardabweichungen, die in den entsprechenden Figuren gezeigt sind.

40

45

Biosensor-Interaktionsanalyse

[0082] Das BIA2000-System (Biacore) wurde verwendet, um die Bindung von BMP-2-Muteine an immobilisierte Rezeptor-Ektodomänen aufzuzeichnen. Die biotinylierten Proteine wurden getrennt an eine Streptavidin-beschichtete Matrix von Biosensor CM5 in Flußzellen **2, 3** und **4** bei einer Dichte von ungefähr 200 Resonanzeinheiten (RU) fixiert, was 200 pg Protein (ungefähr 15 fmol-Rezeptor) pro mm² entspricht. BMP-2-Muteine wurden in Konzentrationen von 15 bis 30 nM in HBS-Puffer (10 mM Hepes, pH 7,4, 500 mM NaCl, 3,4 mM EDTA, 0,005% P20 (Biacore)) über die Flußzellen **1, 2, 3** und **4** in Reihe bei einer Flußrate von 10 µl/min bei 25°C perfundiert, und die Sensogramme wurden bei einer "data sampling rate" von 2,5 Hz aufgenommen. Der Assoziationszeitraum betrug 20 Minuten und der Dissoziationszeitraum war auf 6 Minuten eingestellt. Freie Rezeptoren wurden durch Perfusion mit 0,1 M Essigsäure, 1 M NaCl für 2 Minuten regeneriert. Das Basissensogramm, das für die Flußzelle **1** (Streptavidin-Kontrolle) aufgezeichnet worden war, wurde von den Sensogrammen, die für die Flußzellen **2**(BMPR-II), **3**(ActR-II) und **4**(BMPR-IA) erhalten wurden, subtrahiert. Die differentiellen Sensogramme wurden im Einklang mit der "fitting routine 2" gemäß der BIA-Auswertungs-Software 2.2.4 (Biacore) ausgewertet. Die Gleichgewichtsbindung von BMP-2-Muteinen bei einer Konzentration von 45 nM (EQ₄₅) wurde zweimal doppelt mit einer maximalen Standardabweichung (SD) von +/-20% gemessen. Die angegebenen Geschwindigkeitskonstanten k_{on} für die Assoziationsgeschwindigkeit und K_{off} für die Dissoziationsgeschwindigkeit für die Interaktion zwischen BMPR-IA und BMP-2-Muteinen sind Mittelwerte, die in mindestens 12 Messungen gewonnen worden sind, die mit mindestens drei verschiedenen Konzentrationen der Liganden durchgeführt worden waren. Die Standardabweichungen betrugen 13% für k_{on} und 19% für k_{off}. Weil die wirkliche Stöchiometrie der Komplexbildung noch nicht sicher ist, wurden alle Sensogramme auf der Grundlage eines nicht gesicherten 1 : 1 Assoziationsmodells ausgewertet, und daher werden nur apparente, aber keine absoluten Konstanten angegeben.

50

55

60

65

Beispiel 1

Auswahl von BMP-2 Muteinen

- 5 **[0083]** Um funktionell wichtige Aminosäureseitenketten und Rezeptor-bindende Epitope im reifen Anteil von humanem BMP-2 zu identifizieren, wurden 57 Aminosäurereste einzeln durch in vitro Mutagenese substituiert (Kirsch et al., 2000 (b)). Die substituierten Reste sind in **Fig. 1** über der BMP-2 Sequenz wiedergegeben. Die Muteine wurden in *E. coli* exprimiert. Es wurde ein Satz von 42 Muteinen erhalten, die an 40 verschiedenen Positionen substituiert waren. Die Expression in *E. coli* führte zu dimeren Proteinen, die mit einer Reinheit von besser als 95% und in Ausbeuten, die für die anschließende Analyse der biologischen Aktivität und Rezeptorbindung ausreichend waren, erhalten werden konnten.
- 10 **[0084]** In einer ersten Mutageneserunde wurden 20 Reste mit an der Oberfläche des Moleküls exponierten Seitenketten ausgewählt, die die gesamte Oberfläche des BMP-2 netzförmig überspannen. Nachdem Muteine mit vielversprechenden Phänotypen erhalten worden waren, wurden die juxtaponierten Oberflächenreste systematisch ausgetauscht. Zunächst wurden die Reste durch Alanin ersetzt, um den Beitrag der ersetzten Seitenkette zur Bindungsenergie abschätzen zu können.
- 15 **[0085]** Später wurden die Aminosäurereste durch geladene Reste ersetzt, um die Änderung der phänotypischen Eigenschaften sich nach Einführen einer Ladung zu beobachten.

Beispiel 2

Biologische Aktivität von BMP-2 Muteinen

- 20 **[0085]** Der C2C12-Zelltest, der für die quantitative Bestimmung der biologischen Aktivität der BMP-2 Muteine verwendet worden war, erlaubt es, reproduzierbar relativ kleine Veränderungen festzustellen. Die Maus-Promyoblastenzellen differenzieren unter Hungerbedingungen sehr schnell in multinukleäre Myotuben. BMP-2 inhibiert diesen myogenen Weg und induziert die Bildung von osteoblastenähnlichen Zellen, die für alkalische Phosphatase (ALP) positiv sind.
- 25 BMP-2 induziert dosisabhängig eine hohe alkalische Phosphatase (ALP)-Aktivität in hungrigen C2C12-Zellen mit einer ED_{50} von 20 \pm 10 nM (**Fig. 2B**). Die funktionelle Bedeutung von BMP-2 für die osteoinduktiven Wirkungen von BMP-2 in C2C12-Zellen ist bereits bekannt. Der BMP-2 Rezeptor wird nur in verschwindend geringen Mengen festgestellt und spielt daher in diesen Zellen wahrscheinlich keine funktionelle Rolle. Die Typ II Rezeptoren BMP-2 und ActR-II sind in C2C12-Zellen vorhanden und können mit dem BMP-2 Liganden in Abwesenheit, effizienter aber in Gegenwart von BMP-2 quervernetzt werden. Es ist bis heute nicht eindeutig nachgewiesen, ob beide Typ II Rezeptoren die BMP-2 Antworten in Wirtszellen vermitteln. Einige BMP-2 Muteine wiesen eine eindeutig verringerte Aktivität auf, wenn sie bei einer Konzentration von 250 nM auf C2C12 Zellen untersucht wurden (**Fig. 2A**). Die Muteine A34D und L90A induzieren überhaupt keine signifikante Antwort. Einige andere Mutantenproteine zeigten eine reduzierte Aktivität im Bereich von 2% bis 30% der BMP-2 Aktivität. Die Symbole, die die Aktivität der einzelnen Proteine bei einer Konzentration von 250 nM anzeigen, sind im Einklang mit den Ergebnissen einer Rezeptorinteraktionsanalyse (s. unten) farbig gestaltet. Rote Symbole weisen auf eine reduzierte Affinität für die BMP-2 Ektodomäne hin, während blaue Symbole eine veränderte Wechselwirkung mit der BMP-2 Ektodomäne anzeigen.
- 30 **[0086]** Repräsentative Beispiele von Muteinen mit ungefähr 50% (D30K), weniger als 10% (P50A) und weniger als 1% (A34D) Restaktivität sind in **Fig. 2c** durch Wirkungskurven gezeigt. Weil die BMP-2 Proteine bei Konzentrationen über 500 nM im Kulturmedium präzipitierten, wurden Dosen oberhalb von 250 nM nicht analysiert.
- 35 **[0087]** Die Veränderungen der biologischen Aktivität der beschriebenen Muteine kann von erheblichen Veränderungen in der Struktur, Stabilität oder Solubilität des Proteins infolge von Aminosäuresubstitutionen herrühren. Alternativ können funktionelle Seitenketten, die in die Bindung des Typ I oder Typ II BMP-2 Rezeptors involviert sind, beeinträchtigt worden sein. Die letztere Möglichkeit, dass nämlich spezielle Änderungen in den Muteinen erzeugt worden sind, wurde in den nachfolgend beschriebenen Experimenten überprüft.

Beispiel 3

Antagonistenaktivität

- 50 **[0088]** Überraschenderweise waren einige der Muteine in der Lage, die BMP-2 Aktivität bei Konzentration von 10 bis 250 nM zu inhibieren. Wenn C2C12-Zellen mit einer konstanten Menge BMP-2 in Gegenwart von 250 nM Mutein stimuliert wurden, wurde die Induktion der ALP-Aktivität durch das Mutein A34D auf weniger als 1% reduziert, durch L90A auf ca. 3%, durch L100A auf ungefähr 20% und durch S88A auf 80% des Wertes, der durch BMP-2 in Abwesenheit von Mutantenproteinen induziert wurde (**Fig. 2c**).
- 55 **[0089]** Die inhibitorischen Eigenschaften dieser Antagonisten/partiellen Agonisten wurde durch Bestimmung der Dosis/Inhibitionskurven bestätigt, die in **Fig. 2D** gezeigt sind. Die Mutantenproteine A34D, L90A und L100A inhibierten bei Konzentrationen von 20 bis 40 nM halbmaximal. Dieser IC_{50} Wert ist einer Konzentration von 10 nM BMP-2 während des Tests ähnlich. Dementsprechend arbeiten die inhibitorischen Muteine bei ähnlichen Konzentrationen wie BMP-2, wobei sie höchstwahrscheinlich mit BMP-2 um eine gemeinsame Rezeptorbindungsstelle konkurrieren.
- 60 **[0090]** Der Nachweis der BMP-2 Muteinen mit antagonistischen bzw. partiell agonistischen Eigenschaften zeigt, dass durch die jeweilige Aminosäuresubstitutionen spezielle Änderungen hervorgerufen worden sind, die die Potenz des BMP-2 Proteins beeinträchtigen, aber der Rezeptorbindungsaffinität im großen und ganzen unbeeinträchtigt lassen.
- 65

Wechselwirkung von BMP-2 Muteinen mit Rezeptorektodomänen

[0091] Es ist bereits bekannt, dass es in C2C12-Zellen Typ I BMP-2 Rezeptoren BMPR-IA und die Typ II Rezeptoren BMPR-II und ActR-II gibt, die die BMP-2 Antworten zu vermitteln scheinen. Es bestand daher die entfernte Möglichkeit, dass die funktionellen Veränderungen, die in einigen der BMP-2 Muteinen beobachtet wurden, das Ergebnis spezifischer Veränderungen in BMP-2 Epitopen für die Bindung dieser Rezeptorketten wäre. Diese Hypothese wurde im einzelnen durch eine Wechselwirkungsanalyse untersucht, in der die rekombinanten Ektodomänen von BMPR-IA, BMPR-II und ActR-II eingesetzt wurden. Es wäre schwierig gewesen, in quantitativen Radioliganden-Bindungsexperimenten die Bindung von BMP-2 Muteinen an ganzen Zellen zu untersuchen, da das BMP-2 Protein an die in der extrazellulären Matrix und auf den Zelloberflächen vorhandenen Glykosaminoglykane bindet. Die Wechselwirkung zwischen dem rekombinanten Rezeptor und den Ektodomänen konnte mittels eines Biosensorsystems aufgezeichnet werden. Es ist bereits für andere Rezeptorsysteme gezeigt worden, dass kleine Veränderungen der Bindungsaffinität oder der Kinetik der Ligandenbindung mit Biosensor immobilisierten Rezeptordomänen gezeigt werden können. Es zeigt sich, dass die am Biosensor immobilisierten BMPR-II Rezeptorproteine sehr stabil sind und einige Dutzend Zyklen Ligandenbindung und Dissoziation ohne Veränderung der Bindungseigenschaften überleben. Die Kinetiken und die Gleichgewichtsbindung aller BMP-2 Proteine wurden daher unter den gleichen Bedingungen gemessen. Unterschiede zwischen BMP-2 und den Muteinen konnten so mit Sicherheit festgestellt werden, selbst wenn die Werte der Kinetiken und der Gleichgewichtskonstanten eher relative Werte sind.

[0092] Es wurden Sensogramme aufgezeichnet und ausgewertet, wie sie in **Fig. 3** gezeigt sind. Bei Verwendung immobilisierter BMPR-IA Ektodomäne konnten Unterschiede in den Geschwindigkeitskonstanten der Komplexbildung (k_{on}) und Dissoziation (k_{off}) mit den BMP-2 Muteinen leicht analysiert werden, wie in **Fig. 3A** für Sensogramme gezeigt ist, die alle bei einer 45 nM Konzentration der Muteine aufgezeichnet worden sind. Die Konzentrationsabhängigkeit der Gleichgewichtsbindung von BMP-2, wie in (**Fig. 4A**) führt zu einer apparenten K_d von ungefähr 1 nM. Diese Affinität ist in dem Bereich einer hochaffinen Bindung, wie sie z. B. zwischen hGH und hGHbp oder IL-4 und IL-4R α beobachtet wird, und beruht hauptsächlich auf der niedrigen Dissoziationsgeschwindigkeit des Liganden (apparente $k_{off} \approx 4 \times 10^{-4} s^{-1}$), was eine Halbwertszeit für den Komplex von ungefähr 0,5 Std. bedeutet. Es konnte nicht abschließend festgestellt werden, ob diese außergewöhnlich lange Halbwertszeit durch die gleichzeitige Wechselwirkung von BMP-2 mit 2 immobilisierten Rezeptoren verursacht war, oder ob es aus einer wirklichen 1 : 1 Wechselwirkung resultiert. Die Assoziationsgeschwindigkeit (apparente $k_{on} \approx 7 \times 10^5 M^{-1}s^{-1}$) ist mit der anderer Rezeptoren vergleichbar. Ein Satz von Muteinen wies spezifisch erhöhte Dissoziationsgeschwindigkeiten für den Komplex mit BMPR-IA auf, wobei die K_{off} -Werte 2 bis 5-fach größer als die von BMP-2 waren (s. **Fig. 4C**, hellblaue Symbole). 2 Muteine mit einer Modifikation an Position D30 (D30A, D30K) und 2 Muteine an Position W31 (W31A, W31C) gehören dieser Untergruppe an. Eine andere Untergruppe mit 4 Muteinen wies erniedrigte Geschwindigkeitskonstanten für die Assoziation an die BMPR-IA Ektomäne mit K_{on} -Werten auf, die 5 bis 10-fach niedriger als die vom BMP-2 waren (**Fig. 4C**, dunkelblaue Symbole). Die erniedrigten K_{on} Werte für V26A, F49A, P50A und H54D wurden nur für BMPR-IA, aber nicht für BMPR-II oder ActR-II Wechselwirkungen beobachtet, und können daher nicht auf einer Instabilität oder Unreinheit, d. h. niedrigeren effektiven Konzentrationen dieser Muteine beruhen. Zwei Muteine, nämlich K101E und Y103A, zeigten eine 2-fache Veränderung sowohl bezüglich K_{on} als auch K_{off} . Die Kinetiken der anderen BMP-2 Muteine unterscheiden sich hinsichtlich ihrer Wechselwirkung mit BMPR-IA nicht wesentlich von BMP-2.

[0093] Die Bindung von BMP-2 und BMP-2 Muteinen an die BMPR-II Ektodomäne konnte trotz der niedrigen Affinität dieser Wechselwirkung ebenfalls aufgezeichnet werden (**Fig. 3 B**). Eine apparente Dissoziationskonstante K_d von ungefähr 100 nM wurde aus der Konzentrationsabhängigkeit der Gleichgewichtsbindung abgeleitet, wie in **Fig. 4A** gezeigt. Die Affinität von BMP-II für die ActR-II Ektodomäne erwies sich als geringfügig höher ($K_d \approx 50$ nM). Die apparente K_d für die Bindung von Aktivin an die ActR-II Ektodomäne ist demgegenüber mit 2–7 nM angegeben worden (Donaldson et al., 1999). Die Sensogramme, die in **Fig. 3B** gezeigt sind, zeigen, dass die Muteine eindeutige Unterschiede bezüglich der Gleichgewichtsbindung an den Typ II-Rezeptor BMPR-II aufweisen. Das Mutein A34D band 5-fach schwächer als BMP-2 oder die Muteine D30K und P40A. Die Kinetikkonstanten für die Wechselwirkung zwischen BMP-2 und den Typ II Rezeptoren sind relativ groß ($k_{on} > 10^6 M^{-1}s^{-1}$; $k_{off} > 10^{-2} s^{-1}$). Dies verhinderte eine verlässliche Bewertung der K_{on} - oder k_{off} -Werte. Eine spezifische Untergruppe von Muteinen, die Substitutionen an 5 verschiedenen Positionen aufwiesen, zeigte eine Gleichgewichtsbindung (EQ_{45}) an die BMPR-II Ektodomäne, die 3 bis 15-fach niedriger war als die von BMP-2 (**Fig. 4D**; ausgefüllte Symbole). Diese Abweichungen waren für die BMPR-II Wechselwirkung spezifisch. Die k_{on} Werte dieser Muteine für die BMPR-IA Bindung waren unauffällig.

Beispiel 5

Bindungs determinanten und Antagonisten-/Agonistenaktivität von BMP-2 Muteinen

[0094] Es wurde beobachtet, dass Muteine mit einer erniedrigten Affinität für BMPR-II sich während des C2C12-Test als kompetitive Inhibitoren von BMP-2 verhalten. Die Determinanten der BMP-2 Muteine für die ActR-II Bindung unterscheiden sich von denen vom BMPR-II (**Fig. 4B**). Das Mutein H39D zeigte keine Verringerung, und die Muteine A34D sowie L90A eine nur 2-fache Abnahme der ActR-II Affinität. Die Bindungsaffinität von S88A und L100A war für beide Typ II Rezeptorketten auf ähnliche Weise verändert. Solche differentiellen Wirkungen von Aminosäuresubstitutionen auf die Bindung an verschiedene Rezeptoren erlaubt die Konstruktion selektiver Agonisten, die preferentiell die eine oder andere Rezeptorkette aktivieren.

[0095] Im Unterschied zu anderen Rezeptorsystemen wurden im vorliegenden System keine "hot spots" für die Bindung beobachtet. Es konnte allenfalls eine 5 bis 30-fache Veränderung der Kinetik oder der Gleichgewichtskonstanten in

einigen Muteinen beobachtet werden. Es besteht allerdings die Möglichkeit, dass einige der Hauptdeterminanten in der jetzt vorliegenden Sammlung von BMP-2 Muteinen nicht vertreten sind. Diese möglicherweise fehlenden Determinanten können unter den Resten sein, die nach der Substitution zu Proteinen führten, die nicht exprimiert bzw. gewonnen werden konnten. Beispiele dafür könnten z. B. G27 und W28 sein. Eine andere, eher wahrscheinliche Möglichkeit ist es jedoch, dass Wasserstoffbrückenbindungen, die N- oder O-Atome der Hauptpeptidbindungen involvieren, mit den Rezeptoren wechselwirken und damit zur Bindungsaffinität beitragen.

[0096] Weiter ist es interessant, dass trotz der kleinen Veränderungen in der Bindungsaffinität die biologische Aktivität einiger der Muteine deutlich erniedrigt war. Es kann nicht ausgeschlossen werden, dass einige Muteine durch eine Aminosäuresubstitution destabilisiert sind und während der 3-tägigen Inkubation im Rahmen des C2C12-Testes teilweise inaktiviert werden. Dies kann jedoch nicht für die antagonistischen Muteine gelten, die im Fall von A34D z. B. eine 100-fach verringerte biologische Aktivität aufweisen. Es ist dagegen eher wahrscheinlich, dass die Diskrepanz in dem Ausmaß der Änderungen bei der physikalischen Rezeptorbindung und der zellulären Aktivität in einigen der Muteine von Aviditätseffekten während der Wechselwirkung der multiplen Bindeepitope von BMP-2 mit multimeren zellulären Rezeptoren in der Membran herrühren.

Beispiel 6

Lokalisierung von Bindungsepitopen

[0097] Die Aminosäurepositionen von BMP-2, die die Bindungsaffinität entweder zu BMPR-IA oder BMPR-II Rezeptorketten bestimmen, gehören 2 nicht überlappenden Untergruppen an. Wie in Fig. 1 gezeigt ist, verteilen sich diese Determinanten über die gesamte BMP-2 Sequenz. Das raumfüllende Modell (Scheufler et al., 1999) von Fig. 5 zeigt jedoch, dass die funktionellen Reste 2 getrennte Epitope auf der Oberfläche des homodimeren BMP-2 Moleküls bilden.

[0098] Die Determinanten für die BMPR-IA Wechselwirkung kolokalisieren im Wrist-Epitop, das Reste der Untereinheit 1 (kursive Buchstaben) sowie von Untereinheit 2 (normale Buchstaben) umfasst. Ein Monomer trägt die Reste V26, D30 und W31 aus der langen Schleife bei, die die Faltblätter β -2 und β -3 verbindet, sowie die schwachen Determinanten K101 und Y103, die im Faltblatt β -8 auftreten. Das andere Monomer trägt die Reste I62, L66 und N68 aus der Helix α 3 sowie die Reste F49, P50 und H54 aus der langen Schlaufe vor Helix α 3 bei. Die Muteine mit Substitutionen in dieser letztgenannten Schlaufe weisen bemerkenswerterweise verringerte Assoziationsgeschwindigkeitskonstanten auf. Das mag mit der Beobachtung zusammenhängen, dass die Reste in dieser Schlaufe die höchsten B-Faktoren von 40–90 aufwiesen. Die B-Faktoren sind ein Maß für die Ordnung der Atome im Kristall und für die Genauigkeit, mit der die Atome in dem Proteinmodell definiert sind. Damit sind die B-Faktoren indirekt ein Maß für die Beweglichkeit der Atome in dem Proteinkristall. Eine noch höhere Mobilität dieser Schlaufe in den Muteinen könnte die Wahrscheinlichkeit eines produktiven Zusammentreffens mit BMPR-IA verringern und daher eine Assoziation bremsen. Die schwache Determinante H17 scheint von den anderen funktionellen Wrist-Epitop-Resten getrennt zu sein. Möglicherweise stellen BMP-2 Aminosäurereste, die bis jetzt nicht analysiert sind und zwischen H17 und H54 liegen, weitere Kontaktstellen für BMPR-IA dar.

[0099] Das Knuckle-Epitop von BMP-2, das in die Bindung von BMPR-II involviert ist, setzt sich aus den Resten nur einer Untereinheit zusammen. Die Reste A34 und H39 treten im Faltblatt β 3 bzw. β 4 auf, während S88 und L90 in β 7 und L100 in β 8 vorkommen. Der Rest E109, von dem nach Substitution durch Arginin festgestellt wurde, dass er ein Mutein mit höherer Affinität für BMPR-II ergab, kann ein weiterer Kontaktrest sein. Das Knuckle-Epitop scheint kleiner als das Wrist-Epitop zu sein, da viele Reste an der Grenze zum Knuckle-Epitop verändert werden konnten, ohne eine nachweisbare Wirkung auf die Rezeptorbindung über die biologische Aktivität zu haben. Es kann nicht ausgeschlossen werden, dass das Knuckle-Epitop weitere funktionelle Reste umfasst.

[0100] Das homodimere BMP-2 Protein hat eine 2-fache Symmetrieachse, die in Fig. 5 in der Papierebene liegt und von oben nach unten verläuft. Auf der Rückseite des Proteins gibt es daher ein zweites Paar von Wrist- und Knuckle-Epitopen.

Beispiel 7

Kombination von Aminosäuresubstitutionen in BMP-2 Doppelmutanten

[0101] Die gleichzeitige Substitution von 2 an der niederaffinen Bindung an BMPR-II beteiligten Aminosäuren verstärkt die Auswirkungen auf die biologische Aktivität beträchtlich. Wie aus der nachfolgenden Tabelle III ershen werden kann, war die inhibitorische Aktivität von doppelt substituierten Muteinen beträchtlich erhöht. Erstaunlicherweise zeigte dabei das Kombinationsprotein A34D/D53A, bei dem also sowohl eine Aminosäure aus dem Wrist-Epitop als auch eine Aminosäure aus dem Knuckle-Epitop ersetzt worden sind, bei 20 nM BMP-2 die höchste antagonistische Aktivität aller untersuchten Muteine. Dies könnte auf der Tatsache beruhen, daß die D53A Substitution (Wrist-Epitop) im einfach substituierten Mutein eine Zunahme der BMPR-IA Affinität (und auch der biologischen Aktivität) bewirkt, die für die biologische Aktivität erforderliche Wechselwirkung mit dem BMPR-II jedoch gleichzeitig durch A34D effizient geschwächt ist.

[0102] Insgesamt zeigt sich jedoch, daß die Kombination von zwei Mutationen im Bereich der für die niederaffine Bindung verantwortlichen Aminosäuren eine beträchtliche antagonistische Wirkung zur Folge hat.

Tabelle III

[0103] Erhöhte Effekte bei den kinetischen Konstanten k_{on} und k_{off} für die Assoziation und Dissoziation des Komplexes mit der BMPR-IA Ektodomäne; Gleichgewichtsbindung bei 45 nM Konzentrationen, EQ_{45} , an die BMPR-II und

DE 100 26 713 A 1

ActR-II Ektodomänen. Die Aktivität der Alkalischen Phosphatase in Gegenwart von 250 nM Mutein, ALP(250), wurde in Abwesenheit und Gegenwart von 10 nM oder 20 nM BMP-2 bestimmt.

Mutein	Epitop	BMPR-IA		BMPR-II	ActR-II	ALP(250)			
		K _{on}	K _{off}	EQ ₄₅		-	+10 nM BMP-2	+20 nM BMP-2	
		(var)/(wt)					(% BMP-2)		
BMP-2		1,0	1,0	0,99	1,0		100	320	220
H39D	2	1,1	0,79	0,24	0,79		18	100	82
S88A	2	1,1	0,78	0,29	0,32		2,4	65	71
L100A	2	1,2	0,81	0,22	0,34		2,0	32	18
H39D/S88A	2/2	1,2	0,88	0,09	0,35		<0,5	34	50
H39D/L100A	2/2	1,1	0,90	0,02	0,33		0,6	2,6	4,2
D30A	1	3,0	0,97	1,0	1,0		62	330	220
A34D	2	0,56	0,56	0,06	0,38		<0,5	<0,5	2,9
D53A	1	1,1	1,2	0,99	1,2		130		
D30A/A34D	1/2	1,9	0,85	0,02	0,31		<0,5	2,2	7,4
A34D/D53A	2/1	1,1	1,5	<0,02	0,31		<0,5	<0,5	0,7

Zitierte Literatur

- Astrom et al. (1999), Mamm. Genome 10, S. 299–302
- Blau et al. (1983), Cell 32, S. 1170–1180
- Celeste et al. (1990) Proc Natl Acad Sci USA 87, S. 9843–9847
- DeSantis & Jones (1999) Curr Opin Biotechnol. 10, S. 324–330
- Donaldson et al. (1999), Endocrinology 140, S. 1760–1766
- Kirsch et al. (2000) (a) FEBS Lett 468, S. 215–219
- Kirsch et al. (2000) (b) EMBO J, in revision
- Kirsch et al. M. (2000) (c) Nature Struct Biol, in press
- Madisen et al. (1998) DNA 7, S. 1–8
- Massague et al. (1998), Ann. Rev. Biochem. 67, S. 753–791
- Matzuk & Bradley (1992), Biochem. Biophys. Acta 1130, S. 105–108
- Rosenzweig et al. (1995), Proc. Natl. Acad. Sci. USA 92, 7632–7636
- Ruppert et al. (1996), Eur. J. Biochem. 237, S. 295–302
- Scheufler et al. (1999) J Mol Biol 287, S. 103–115
- Shen et al. (1999), Eur. J. Biochem. 240, S. 252–261
- ten Dijke et al. (1993), Oncogene 8, S. 2879–2887
- Wang et al. (1997), Proc. Natl. Acad. Sci. USA 94, S. 1657–1662
- Wozney et al. (1998) Science 242, S. 1528–1534
- Wuytens et al. (1999) J Biol Chem 274, S. 9821–9827.

DE 100 26 713 A 1

SEQUENZPROTOKOLL

<110> Sebald, Walter

5 <120> Mutein einer Kette eines Proteins aus der Superfamilie
des Wachstumsfaktors TGF-beta

10 <130> p31262

<140>
<141>

15 <160> 30

<170> PatentIn Ver. 2.1

20 <210> 1
<211> 114
<212> PRT
25 <213> Homo sapiens

<220>
30 <223> hBMP-2

<400> 1

Gln	Ala	Lys	His	Lys	Gln	Arg	Lys	Arg	Leu	Lys	Ser	Ser	Cys	Lys	Arg
1				5					10					15	
His	Pro	Leu	Tyr	Val	Asp	Phe	Ser	Asp	Val	Gly	Trp	Asn	Asp	Trp	Ile
			20						25					30	
Val	Ala	Pro	Pro	Gly	Tyr	His	Ala	Phe	Tyr	Cys	His	Gly	Glu	Cys	Pro
		35					40					45			
Phe	Pro	Leu	Ala	Asp	His	Leu	Asn	Ser	Thr	Asn	His	Ala	Ile	Val	Gln
		50					55					60			
Thr	Leu	Val	Asn	Ser	Val	Asn	Ser	Lys	Ile	Pro	Lys	Ala	Cys	Cys	Val
65						70				75					80
Pro	Thr	Glu	Leu	Ser	Ala	Ile	Ser	Met	Leu	Tyr	Leu	Asp	Glu	Asn	Glu
				85					90					95	
Lys	Val	Val	Leu	Lys	Asn	Tyr	Gln	Asp	Met	Val	Val	Glu	Gly	Cys	Gly
100								105						110	
Cys	Arg														

65

DE 100 26 713 A 1

<210> 2
 <211> 116
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens 5

 <220>
 <223> hBMP-4 10

 <400> 2
 Ser Pro Lys His His Ser Gln Arg Ala Arg Lys Lys Asn Lys Asn Cys 15
 1 5 10 15

 Arg Arg His Ser Leu Tyr Val Asp Phe Ser Asp Val Gly Trp Asn Asp 20
 20 25 30

 Trp Ile Val Ala Pro Pro Gly Tyr Gln Ala Phe Tyr Cys His Gly Asp 25
 35 40 45

 Cys Pro Phe Pro Leu Ala Asp His Leu Asn Ser Thr Asn His Ala Ile 30
 50 55 60

 Val Gln Thr Leu Val Asn Ser Val Asn Ser Ser Ile Pro Lys Ala Cys 35
 65 70 75 80

 Cys Val Pro Thr Glu Leu Ser Ala Ile Ser Met Leu Tyr Leu Asp Glu 40
 85 90 95

 Tyr Asp Lys Val Val Leu Lys Asn Tyr Gln Glu Met Val Val Glu Gly 45
 100 105 110

 Cys Gly Cys Arg 50
 115

 <210> 3
 <211> 110
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens 55

 <220>
 <223> hBMP-3

 <400> 3
 Gln Trp Ile Glu Pro Arg Asn Cys Ala Arg Arg Tyr Leu Lys Val Asp 60
 1 5 10 15

 65

DE 100 26 713 A 1

Phe Ala Asp Ile Gly Trp Ser Glu Trp Ile Ile Ser Pro Lys Ser Phe
 20 25 30
 5 Asp Ala Tyr Tyr Cys Ser Gly Ala Cys Gln Phe Pro Met Pro Lys Ser
 35 40 45
 10 Leu Lys Pro Ser Asn His Ala Thr Ile Gln Ser Ile Val Arg Ala Val
 50 55 60
 Gly Val Val Pro Gly Ile Pro Glu Pro Cys Cys Val Pro Glu Lys Met
 15 65 70 75 80
 Ser Ser Leu Ser Ile Leu Phe Phe Asp Glu Asn Lys Asn Val Val Leu
 20 85 90 95
 Lys Val Tyr Pro Asn Met Thr Val Glu Ser Cys Ala Cys Arg
 100 105 110
 25
 <210> 4
 <211> 132
 30 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 35 <220>
 <223> hBMP-5
 40 <400> 4
 Asn Gln Asn Arg Asn Lys Ser Ser Ser His Gln Asp Ser Ser Arg Met
 1 5 10 15
 Ser Ser Val Gly Asp Tyr Asn Thr Ser Glu Gln Lys Gln Ala Cys Lys
 45 20 25 30
 Lys His Glu Leu Tyr Val Ser Phe Arg Asp Leu Gly Trp Gln Asp Trp
 50 35 40 45
 Ile Ile Ala Pro Glu Gly Tyr Ala Ala Phe Tyr Cys Asp Gly Glu Cys
 50 55 60
 55 Ser Phe Pro Leu Asn Ala His Met Asn Ala Thr Asn His Ala Ile Val
 65 70 75 80
 60 Gln Thr Leu Val His Leu Met Phe Pro Asp His Val Pro Lys Pro Cys
 85 90 95
 65 Cys Ala Pro Thr Lys Leu Asn Ala Ile Ser Val Leu Tyr Phe Asp Asp
 100 105 110

DE 100 26 713 A 1

Ser Ser Asn Val Ile Leu Lys Lys Tyr Arg Asn Met Val Val Arg Ser
115 120 125

Cys Gly Cys His
130

<210> 5
<211> 132
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<223> hBMP-6

<400> 5
Gln Gln Ser Arg Asn Arg Ser Thr Gln Ser Gln Asp Val Ala Arg Val
1 5 10 15

Ser Ser Ala Ser Asp Tyr Asn Ser Ser Glu Leu Lys Thr Ala Cys Arg
20 25 30

Lys His Glu Leu Tyr Val Ser Phe Gln Asp Leu Gly Trp Gln Asp Trp
35 40 45

Ile Ile Ala Pro Lys Gly Tyr Ala Ala Asn Tyr Cys Asp Gly Glu Cys
50 55 60

Ser Phe Pro Leu Asn Ala His Met Asn Ala Thr Asn His Ala Ile Val
65 70 75 80

Gln Thr Leu Val His Leu Met Asn Pro Glu Tyr Val Pro Lys Pro Cys
85 90 95

Cys Ala Pro Thr Lys Leu Asn Ala Ile Ser Val Leu Tyr Phe Asp Asp
100 105 110

Asn Ser Asn Val Ile Leu Lys Lys Tyr Arg Asn Met Val Val Arg Ala
115 120 125

Cys Gly Cys His
130

5
10
15
20
25
30
35
40
45
50
55
60
65

DE 100 26 713 A 1

<213> Homo sapiens

<220>

5 <223> hBMP-7

<400> 6

```

10 Ser Thr Gly Ser Lys Gln Arg Ser Gln Asn Arg Ser Lys Thr Pro Lys
    1          5          10          15

    Asn Gln Glu Ala Leu Arg Met Ala Asn Val Ala Glu Asn Ser Ser Ser
15          20          25          30

    Asp Gln Arg Gln Ala Cys Lys Lys His Glu Leu Tyr Val Ser Phe Arg
20          35          40          45

    Asp Leu Gly Trp Gln Asp Trp Ile Ile Ala Pro Glu Gly Tyr Ala Ala
    50          55          60

25 Tyr Tyr Cys Glu Gly Glu Cys Ala Phe Pro Leu Asn Ser Tyr Met Asn
    65          70          75          80

30 Ala Thr Asn His Ala Ile Val Gln Thr Leu Val His Phe Ile Asn Pro
    85          90          95

35 Glu Thr Val Pro Lys Pro Cys Cys Ala Pro Thr Gln Leu Asn Ala Ile
    100          105          110

    Ser Val Leu Tyr Phe Asp Asp Ser Ser Asn Val Ile Leu Lys Lys Tyr
40          115          120          125

    Arg Asn Met Val Val Arg Ala Cys Gly Cys His
45          130          135

```

<210> 7

50 <211> 139.

<212> PRT

<213> Homo sapiens

55 <220>

<223> hBMP-8

<400> 7

```

60 Ala Val Arg Pro Leu Arg Arg Arg Gln Pro Lys Lys Ser Asn Glu Leu
    1          5          10          15

65 Pro Gln Ala Asn Arg Leu Pro Gly Ile Phe Asp Asp Val His Gly Ser
    20          25          30

```

DE 100 26 713 A 1

His Gly Arg Gln Val Cys Arg Arg His Glu Leu Tyr Val Ser Phe Gln	
35 40 45	
Asp Leu Gly Trp Leu Asp Trp Val Ile Ala Pro Gln Gly Tyr Ser Ala	5
50 55 60	
Tyr Tyr Cys Glu Gly Glu Cys Ser Phe Pro Leu Asp Ser Cys Met Asn	10
65 70 75 80	
Ala Thr Asn His Ala Ile Leu Gln Ser Leu Val His Leu Met Lys Pro	15
85 90 95	
Asn Ala Val Pro Lys Ala Cys Cys Ala Pro Thr Lys Leu Ser Ala Thr	20
100 105 110	
Ser Val Leu Tyr Tyr Asp Ser Ser Asn Asn Val Ile Leu Arg Lys His	25
115 120 125	
Arg Asn Met Val Val Lys Ala Cys Gly Cys His	30
130 135	
<210> 8	
<211> 108	
<212> PRT	35
<213> Homo sapiens	
<220>	
<223> hBMP-10	40
<400> 8	
Asn Ala Lys Gly Asn Tyr Cys Lys Arg Thr Pro Leu Tyr Ile Asp Phe	45
1 5 10 15	
Lys Glu Ile Gly Trp Asp Ser Trp Ile Ile Ala Pro Pro Gly Tyr Glu	50
20 25 30	
Ala Tyr Glu Cys Arg Gly Val Cys Asn Tyr Pro Leu Ala Glu His Leu	55
35 40 45	
Thr Pro Thr Lys His Ala Ile Ile Gln Ala Leu Val His Leu Lys Asn	60
50 55 60	
Ser Gln Lys Ala Ser Lys Ala Cys Cys Val Pro Thr Lys Leu Glu Pro	65
65 70 75 80	
Ile Ser Ile Leu Tyr Leu Asp Lys Gly Val Val Thr Tyr Lys Phe Lys	65

DE 100 26 713 A 1

```

85
90
95

5  Tyr Glu Gly Met Ala Val Ser Glu Cys Gly Cys Arg
    100                      105

10 <210> 9
    <211> 109
    <212> PRT
    <213> Homo sapiens

15
    <220>
    <223> hBMP-11-

20
    <400> 9
    Asn Leu Gly Leu Asp Cys Asp Glu His Ser Ser Glu Ser Arg Cys Cys
      1              5              10              15

25
    Arg Tyr Pro Leu Thr Val Asp Phe Glu Ala Phe Gly Trp Asp Trp Ile
      20              25              30

30
    Ile Ala Pro Lys Arg Tyr Lys Ala Asn Tyr Cys Ser Gly Gln Cys Glu
      35              40              45

35
    Tyr Met Phe Met Gln Lys Tyr Pro His Thr His Leu Val Gln Gln Ala
      50              55              60

    Asn Pro Arg Gly Ser Ala Gly Pro Cys Cys Thr Pro Thr Lys Met Ser
40  65              70              75              80

    Pro Ile Asn Met Leu Tyr Phe Asn Asp Lys Gln Gln Ile Ile Tyr Gly
45              85              90              95

    Lys Ile Pro Gly Met Val Val Asp Arg Cys Gly Cys Ser
      100              105

50

    <210> 10
    <211> 125
55 <212> PRT
    <213> Homo sapiens

    <220>
60 <223> hBMP-15

    <400> 10
65 Gln Ala Cys Ser Ile Glu Ser Asp Ala Ser Cys Pro Ser Gln Glu His
    1              5              10              15

```

DE 100 26 713 A 1

Asp Gly Ser Val Asn Asn Gln Cys Ser Leu His Pro Tyr Lys Val Ser	
20 25 30	
Phe His Gln Leu Gly Trp Asp His Trp Ile Ile Ala Pro Arg Leu Tyr	5
35 40 45	
Thr Pro Asn Tyr Cys Lys Gly Ile Cys Thr Arg Val Leu Pro Tyr Gly	10
50 55 60	
Leu Asn Ser Pro Asn His Ala Ile Ile Gln Ser Leu Val Asn Glu Leu	15
65 70 75 80	
Val Asn His Ser Val Pro Gln Pro Ser Cys Val Pro Tyr Asn Phe Leu	20
85 90 95	
Pro Met Ser Ile Leu Leu Ile Glu Thr Asn Gly Ser Ile Leu Tyr Lys	25
100 105 110	
Glu Tyr Glu Gly Met Ile Ala Gln Ser Cys Thr Cys Arg	30
115 120 125	
<210> 11	
<211> 119	
<212> PRT	35
<213> Homo sapiens	
<220>	
<223> hGDF-1	40
<400> 11	
Asp Ala Glu Pro Val Leu Gly Gly Gly Pro Gly Gly Ala Cys Arg Ala	45
1 5 10 15	
Arg Arg Leu Tyr Val Ser Phe Arg Glu Val Gly Trp His Arg Trp Val	50
20 25 30	
Ile Ala Pro Arg Gly Phe Leu Ala Asn Tyr Cys Gln Gly Gln Cys Ala	55
35 40 45	
Leu Pro Val Ala Leu Ser Gly Ser Gly Gly Pro Pro Ala Leu Asn His	60
50 55 60	
Ala Val Leu Arg Ala Leu Met His Ala Ala Ala Pro Gly Ala Ala Asp	65
65 70 75 80	
Leu Pro Cys Cys Val Pro Ala Arg Leu Ser Pro Ile Ser Val Leu Phe	65

DE 100 26 713 A 1

	85	90	95
5	Phe Asp Asn Ser Asp Asn Val Val	Leu Arg Gln Tyr Glu Asp Met Val	
	100	105	110
10	Val Asp Glu Cys Gly Cys Arg		
	115		
15	<210> 12		
	<211> 110		
	<212> PRT		
	<213> Homo sapiens		
20	<220>		
	<223> hGDF-2		
25	<400> 12		
	Ser Ala Gly Ala Gly Ser His Cys Gln Lys Thr Ser Leu Arg Val Asn		
	1 5 10 15		
30	Phe Glu Asp Ile Gly Trp Asp Ser Trp Ile Ile Ala Pro Lys Glu Tyr		
	20 25 30		
35	Glu Ala Tyr Glu Cys Lys Gly Gly Cys Phe Phe Pro Leu Ala Asp Asp		
	35 40 45		
40	Val Thr Pro Thr Lys His Ala Ile Val Gln Thr Leu Val His Leu Lys		
	50 55 60		
45	Phe Pro Thr Lys Val Gly Lys Ala Cys Cys Val Pro Thr Lys Leu Ser		
	65 70 75 80		
50	Pro Ile Ser Val Leu Tyr Lys Asp Asp Met Gly Val Pro Thr Leu Lys		
	85 90 95		
55	Tyr His Tyr Glu Gly Met Ser Val Ala Glu Cys Gly Cys Arg		
	100 105 110		
60	<210> 13		
	<211> 114		
	<212> PRT		
	<213> Mus musculus		
65	<220>		
	<223> mGDF-3		

DE 100 26 713 A 1

<400> 13

Ala Ala Ile Ser Val Pro Lys Gly Phe Cys Arg Asn Phe Cys His Arg
1 5 10 15

5

His Gln Leu Phe Ile Asn Phe Gln Asp Leu Gly Trp His Lys Trp Val
20 25 30

10

Ile Ala Pro Lys Gly Phe Met Ala Asn Tyr Cys His Gly Glu Cys Pro
35 40 45

Phe Ser Met Thr Thr Tyr Leu Asn Ser Ser Asn Tyr Ala Phe Met Gln
50 55 60

15

Ala Leu Met His Met Ala Asp Pro Lys Val Pro Lys Ala Val Cys Val
65 70 75 80

20

Pro Thr Lys Leu Ser Pro Ile Ser Met Leu Tyr Gln Asp Ser Asp Lys
85 90 95

25

Asn Val Ile Leu Arg His Tyr Glu Asp Met Val Val Asp Glu Cys Gly
100 105 110

30

Cys Gly

35

<210> 14

<211> 120

<212> PRT

40

<213> Homo sapiens

<220>

<223> hGDF-5

45

<400> 14

Ala Pro Ser Ala Thr Arg Gln Gly Lys Arg Pro Ser Lys Asn Leu Lys
1 5 10 15

50

Ala Arg Cys Ser Arg Lys Ala Leu His Val Asn Phe Lys Asp Met Gly
20 25 30

55

Trp Asp Asp Trp Ile Ile Ala Pro Leu Glu Tyr Glu Ala Phe His Cys
35 40 45

60

Glu Gly Leu Cys Glu Phe Pro Leu Arg Ser His Leu Glu Pro Thr Asn
50 55 60

His Ala Val Ile Gln Thr Leu Met Asn Ser Met Asp Pro Glu Ser Thr

65

DE 100 26 713 A 1

	65		70		75		80
--	----	--	----	--	----	--	----

5 Pro Pro Thr Cys Cys Val Pro Thr Arg Leu Ser Pro Ile Ser Ile Leu
 85 90 95

10 Phe Ile Asp Ser Ala Asn Asn Val Val Tyr Lys Gln Tyr Glu Asp Met
 100 105 110

15 Val Val Glu Ser Cys Gly Cys Arg
 115 120

20 <210> 15
 <211> 120
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

25 <220>
 <223> mGDF-6

30 <400> 15
 Thr Ala Phe Ala Ser Arg His Gly Lys Arg His Gly Lys Lys Ser Arg
 1 5 10 15

35 Leu Arg Cys Ser Arg Lys Pro Leu His Val Asn Phe Lys Glu Leu Gly
 20 25 30

40 Trp Asp Asp Trp Ile Ile Ala Pro Leu Glu Tyr Glu Ala Tyr His Cys
 35 40 45

45 Glu Gly Val Cys Asp Phe Pro Leu Arg Ser His Leu Glu Pro Thr Asn
 50 55 60

50 His Ala Ile Ile Gln Thr Leu Met Asn Ser Met Asp Pro Gly Ser Thr
 65 70 75 80

55 Pro Pro Ser Cys Cys Val Pro Thr Lys Leu Thr Pro Ile Ser Ile Leu
 85 90 95

60 Tyr Ile Asp Ala Gly Asn Asn Val Val Tyr Lys Gln Tyr Glu Asp Met
 100 105 110

65 Val Val Glu Ser Cys Gly Cys Arg
 115 120

65 <210> 16
 <211> 146

DE 100 26 713 A 1

<212> PRT
 <213> Mus musculus

 <220> 5
 <223> mGDF-7

 <400> 16 10
 Thr Ala Leu Ala Gly Thr Arg Gly Ala Gln Gly Ser Gly Gly Gly Gly
 1 5 10 15

 Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly
 20 25 30 15

 Ala Gly Arg Gly His Gly Arg Arg Gly Arg Ser Arg Cys Ser Arg Lys
 35 40 45 20

 Ser Leu His Val Asp Phe Lys Glu Leu Gly Trp Asp Asp Trp Ile Ile
 50 55 60 25

 Ala Pro Leu Asp Tyr Glu Ala Tyr His Cys Glu Gly Val Cys Asp Phe
 65 70 75 80 30

 Pro Leu Arg Ser His Leu Glu Pro Thr Asn His Ala Ile Ile Gln Thr
 85 90 95

 Leu Leu Asn Ser Met Ala Pro Asp Ala Ala Pro Ala Ser Cys Cys Val
 100 105 110 35

 Pro Ala Arg Leu Ser Pro Ile Ser Ile Leu Tyr Ile Asp Ala Ala Asn
 115 120 125 40

 Asn Val Val Tyr Lys Gln Tyr Glu Asp Met Val Val Glu Ala Cys Gly
 130 135 140 45

 Cys Arg
 145 50

 <210> 17
 <211> 109 55
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

 <220> 60
 <223> hGDF-8

 <400> 17 65
 Asp Phe Gly Leu Asp Cys Asp Glu His Ser Thr Glu Ser Arg Cys Cys

DE 100 26 713 A 1

1	5	10	15
5	Arg Tyr Pro Leu Thr Val Asp Phe Glu Ala Phe Gly Trp Asp Trp Ile		
	20	25	30
10	Ile Ala Pro Lys Arg Tyr Lys Ala Asn Tyr Cys Ser Gly Glu Cys Glu		
	35	40	45
15	Phe Val Phe Leu Gln Lys Tyr Pro His Thr His Leu Val His Gln Ala		
	50	55	60
20	Asn Pro Arg Gly Ser Ala Gly Pro Cys Cys Thr Pro Thr Lys Met Ser		
	65	70	75
25	Pro Ile Asn Met Leu Tyr Phe Asn Gly Lys Glu Gln Ile Ile Tyr Gly		
	85	90	95
30	Lys Ile Pro Ala Met Val Val Asp Arg Cys Gly Cys Ser		
	100	105	
35	<210> 18		
	<211> 135		
	<212> PRT		
	<213> Homo sapiens		
40	<220>		
	<223> hGDF-9		
45	<400> 18		
	Gly Gln Glu Thr Val Ser Ser Glu Leu Lys Lys Pro Leu Gly Pro Ala		
	1	5	10
50	Ser Phe Asn Leu Ser Glu Tyr Phe Arg Gln Phe Leu Leu Pro Gln Asn		
	20	25	30
55	Glu Cys Glu Leu His Asp Phe Arg Leu Ser Phe Ser Gln Leu Lys Trp		
	35	40	45
60	Asp Asn Trp Ile Val Ala Pro His Arg Tyr Asn Pro Arg Tyr Cys Lys		
	50	55	60
65	Gly Asp Cys Pro Arg Ala Val Gly His Arg Tyr Gly Ser Pro Val His		
	65	70	75
	Thr Met Val Gln Asn Ile Ile Tyr Glu Lys Leu Asp Ser Ser Val Pro		
	85	90	95

DE 100 26 713 A 1

Arg Pro Ser Cys Val Pro Ala Lys Tyr Ser Pro Leu Ser Val Leu Thr	
100 105 110	
Ile Glu Pro Asp Gly Ser Ile Ala Tyr Lys Glu Tyr Glu Asp Met Ile	5
115 120 125	
Ala Thr Lys Cys Thr Cys Arg	10
130 135	
<210> 19	15
<211> 125	
<212> PRT	
<213> Homo sapiens	20
<220>	
<223> hGDF-9b	25
<400> 19	
Gln Ala Asp Gly Ile Ser Ala Glu Val Thr Ala Ser Ser Ser Lys His	
1 5 10 15	30
Ser Gly Pro Glu Asn Asn Gln Cys Ser Leu His Pro Phe Gln Ile Ser	
20 25 30	
Phe Arg Gln Leu Gly Trp Asp His Trp Ile Ile Ala Pro Pro Phe Tyr	35
35 40 45	
Thr Pro Asn Tyr Cys Lys Gly Thr Cys Leu Arg Val Leu Arg Asp Gly	40
50 55 60	
Leu Asn Ser Pro Asn His Ala Ile Ile Gln Asn Leu Ile Asn Gln Leu	45
65 70 75 80	
Val Asp Gln Ser Val Pro Arg Pro Ser Cys Val Pro Tyr Lys Tyr Val	
85 90 95	50
Pro Ile Ser Val Leu Met Ile Glu Ala Asn Gly Ser Ile Leu Tyr Lys	
100 105 110	55
Glu Tyr Glu Gly Met Ile Ala Glu Ser Cys Thr Cys Arg	
115 120 125	60
<210> 20	
<211> 110	
<212> PRT	
<213> Homo sapiens	65

DE 100 26 713 A 1

<220>

<223> hGDF-10

5

<400> 20

Gln Trp Asp Glu Pro Arg Val Cys Ser Arg Arg Tyr Leu Lys Val Asp
1 5 10 15

10

Phe Ala Asp Ile Gly Trp Asn Glu Trp Ile Ile Ser Pro Lys Ser Phe
20 25 30

15

Asp Ala Tyr Tyr Cys Ala Gly Ala Cys Glu Phe Pro Met Pro Lys Ile
35 40 45

20

Val Arg Pro Ser Asn His Ala Thr Ile Gln Ser Ile Val Arg Ala Val
50 55 60

25

Gly Ile Ile Pro Gly Ile Pro Glu Pro Cys Cys Val Pro Asp Lys Met
65 70 75 80

30

Asn Ser Leu Gly Val Leu Phe Leu Asp Glu Asn Arg Asn Val Val Leu
85 90 95

Lys Val Tyr Pro Asn Met Ser Val Asp Thr Cys Ala Cys Arg
100 105 110

35

<210> 21

40

<211> 112

<212> PRT

<213> Homo sapiens

45

<220>

<223> hTGF-b1

50

<400> 21

Ala Leu Asp Thr Asn Tyr Cys Phe Ser Ser Thr Glu Lys Asn Cys Cys
1 5 10 15

55

Val Arg Gln Leu Tyr Ile Asp Phe Arg Lys Asp Leu Gly Trp Lys Trp
20 25 30

60

Ile His Glu Pro Lys Gly Tyr His Ala Asn Phe Cys Leu Gly Pro Cys
35 40 45

65

Pro Tyr Ile Trp Ser Leu Asp Thr Gln Tyr Ser Lys Val Leu Ala Leu
50 55 60

DE 100 26 713 A 1

Tyr	Asn	Gln	His	Asn	Pro	Gly	Ala	Ser	Ala	Ala	Pro	Cys	Cys	Val	Pro
65					70					75					80

Gln Ala Leu Glu Pro Leu Pro Ile Val Tyr Tyr Val Gly Arg Lys Pro
85 90 95

Lys Val Glu Gln Leu Ser Asn Met Ile Val Arg Ser Cys Lys Cys Ser
100 105 110

<210> 22

<211> 112

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<223> hTGF-b2

<400> 22

Ala Leu Asp Ala Ala Tyr Cys Phe Arg Asn Val Gln Asp Asn Cys Cys
1 5 10 15

Leu Arg Pro Leu Tyr Ile Asp Phe Lys Arg Asp Leu Gly Trp Lys Trp
20 25 30

Ile His Glu Pro Lys Gly Tyr Asn Ala Asn Phe Cys Ala Gly Ala Cys
35 40 45

Pro Tyr Leu Trp Ser Ser Asp Thr Gln His Ser Arg Val Leu Ser Leu
50 55 60

Tyr Asn Thr Ile Asn Pro Glu Ala Ser Ala Ser Pro Cys Cys Val Ser
65 70 75 80

Gln Asp Leu Glu Pro Leu Thr Ile Leu Tyr Tyr Ile Gly Lys Thr Pro
85 90 95

Lys Ile Glu Gln Leu Ser Asn Met Ile Val Lys Ser Cys Lys Cys Ser
100 105 110

DE 100 26 713 A 1

<210> 23
 <211> 112
 <212> PRT
 5 <213> Homo sapiens

 <220>
 10 <223> hTGF-b3

 <400> 23
 Ala Leu Asp Thr Asn Tyr Cys Phe Arg Asn Leu Glu Glu Asn Cys Cys
 15 1 5 10 15

 Val Arg Pro Leu Tyr Ile Asp Phe Arg Gln Asp Leu Gly Trp Lys Trp
 20 20 25 30

 Val His Glu Pro Lys Gly Tyr Tyr Ala Asn Phe Cys Ser Gly Pro Cys
 25 35 40 45

 Pro Tyr Leu Arg Ser Ala Asp Thr Thr His Ser Thr Val Leu Gly Leu
 50 55 60

 30 Tyr Asn Thr Leu Asn Pro Glu Ala Ser Ala Ser Pro Cys Cys Val Pro
 65 70 75 80

 35 Gln Asp Leu Glu Pro Leu Thr Ile Leu Tyr Tyr Val Gly Arg Thr Pro
 85 90 95

 Lys Val Glu Gln Leu Ser Asn Met Val Val Lys Ser Cys Lys Cys Ser
 40 100 105 110

 45

 <210> 24
 50 <211> 134
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

 55 <220>
 <223> hInh-a

 <400> 24
 60 Ser Thr Pro Leu Met Ser Trp Pro Trp Ser Pro Ser Ala Leu Arg Leu
 1 5 10 15

 65 Leu Gln Arg Pro Pro Glu Glu Pro Ala Ala His Ala Asn Cys His Arg
 20 25 30

DE 100 26 713 A 1

Val Ala Leu Asn Ile Ser Phe Gln Glu Leu Gly Trp Glu Arg Trp Ile	
35 40 45	
Val Tyr Pro Pro Ser Phe Ile Phe His Tyr Cys His Gly Gly Cys Gly	5
50 55 60	
Leu His Ile Pro Pro Asn Leu Ser Leu Pro Val Pro Gly Ala Pro Pro	10
65 70 75 80	
Thr Pro Ala Gln Pro Tyr Ser Leu Leu Pro Gly Ala Gln Pro Cys Cys	15
85 90 95	
Ala Ala Leu Pro Gly Thr Met Arg Pro Leu His Val Arg Thr Thr Ser	20
100 105 110	
Asp Gly Gly Tyr Ser Phe Lys Tyr Glu Thr Val Pro Asn Leu Leu Thr	25
115 120 125	
Gln His Cys Ala Cys Ile	30
130	
<210> 25	
<211> 116	
<212> PRT	35
<213> Homo sapiens	
<220>	
<223> hAct-A	40
<400> 25	
Gly Leu Glu Cys Asp Gly Lys Val Asn Ile Cys Cys Lys Lys Gln Phe	45
1 5 10 15	
Phe Val Ser Phe Lys Asp Ile Gly Trp Asn Asp Trp Ile Ile Ala Pro	50
20 25 30	
Ser Gly Tyr His Ala Asn Tyr Cys Glu Gly Glu Cys Pro Ser His Ile	55
35 40 45	
Ala Gly Thr Ser Gly Ser Ser Leu Ser Phe His Ser Thr Val Ile Asn	60
50 55 60	
His Tyr Arg Met Arg Gly His Ser Pro Phe Ala Asn Leu Lys Ser Cys	65
65 70 75 80	
Cys Val Pro Thr Lys Leu Arg Pro Met Ser Met Leu Tyr Tyr Asp Asp	65

DE 100 26 713 A 1

	85	90	95
5	Gly Gln Asn Ile Ile Lys Lys Asp Ile Gln Asn Met Ile Val Glu Glu		
	100	105	110
	Cys Gly Cys Ser		
10	115		
	<210> 26		
15	<211> 115		
	<212> PRT		
	<213> Homo sapiens		
20	<220>		
	<223> hAct-B		
25	<400> 26		
	Gly Leu Glu Cys Asp Gly Arg Thr Asn Leu Cys Cys Arg Gln Gln Phe		
	1 5 10 15		
30	Phe Ile Asp Phe Arg Leu Ile Gly Trp Asn Asp Trp Ile Ile Ala Pro		
	20 25 30		
35	Thr Gly Tyr Tyr Gly Asn Tyr Cys Glu Gly Ser Cys Pro Ala Tyr Leu		
	35 40 45		
	Ala Gly Val Pro Gly Ser Ala Ser Ser Phe His Thr Ala Val Val Asn		
40	50 55 60		
	Gln Tyr Arg Met Arg Gly Leu Asn Pro Gly Thr Val Asn Ser Cys Cys		
45	65 70 75 80		
	Ile Pro Thr Lys Leu Ser Thr Met Ser Met Leu Tyr Phe Asp Asp Glu		
	85 90 95		
50	Tyr Asn Ile Val Lys Arg Asp Val Pro Asn Met Ile Val Glu Glu Cys		
	100 105 110		
55	Gly Cys Ala		
	115		
60	<210> 27		
	<211> 116		
	<212> PRT		
65	<213> Homo sapiens		

DE 100 26 713 A 1

<220>

<223> hAct-C

<400> 27

Gly Ile Asp Cys Gln Gly Gly Ser Arg Met Cys Cys Arg Gln Glu Phe
1 5 10 15

Phe Val Asp Phe Arg Glu Ile Gly Trp His Asp Trp Ile Ile Gln Pro
20 25 30

Glu Gly Tyr Ala Met Asn Phe Cys Ile Gly Gln Cys Pro Leu His Ile
35 40 45

Ala Gly Met Pro Gly Ile Ala Ala Ser Phe His Thr Ala Val Leu Asn
50 55 60

Leu Leu Lys Ala Asn Thr Ala Ala Gly Thr Thr Gly Gly Gly Ser Cys
65 70 75 80

Cys Val Pro Thr Ala Arg Arg Pro Leu Ser Leu Leu Tyr Tyr Asp Arg
85 90 95

Asp Ser Asn Ile Val Lys Thr Asp Ile Pro Asp Met Val Val Glu Ala
100 105 110

Cys Gly Cys Ser
115

<210> 28

<211> 109

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<223> hMIS

<400> 28

Ser Ala Gly Ala Thr Ala Ala Asp Gly Pro Cys Ala Leu Arg Glu Leu
1 5 10 15

Ser Val Asp Leu Arg Ala Glu Arg Ser Val Leu Ile Pro Glu Thr Tyr
20 25 30

Gln Ala Asn Asn Cys Gln Gly Val Cys Gly Trp Pro Gln Ser Asp Arg
35 40 45

Asn Pro Arg Tyr Gly Asn His Val Val Leu Leu Leu Lys Met Gln Ala

DE 100 26 713 A 1

```

50                               55                               60

5  Arg Gly Ala Ala Leu Ala Arg Pro Pro Cys Cys Val Pro Thr Ala Tyr
   65                               70                               75                               80

   Ala Gly Lys Leu Leu Ile Ser Leu Ser Glu Glu Arg Ile Ser Ala His
10                               85                               90                               95

   His Val Pro Asn Met Val Ala Thr Glu Cys Gly Cys Arg
   100                               105

15

   <210> 29
   <211> 134
20  <212> PRT
   <213> Homo sapiens

25  <220>
   <223> hGDNF

   <400> 29
30  Ser Pro Asp Lys Gln Met Ala Val Leu Pro Arg Arg Glu Arg Asn Arg
   1                               5                               10                               15

   Gln Ala Ala Ala Ala Asn Pro Glu Asn Ser Arg Gly Lys Gly Arg Arg
35                               20                               25                               30

   Gly Gln Arg Gly Lys Asn Arg Gly Cys Val Leu Thr Ala Ile His Leu
40                               35                               40                               45

   Asn Val Thr Asp Leu Gly Leu Gly Tyr Glu Thr Lys Glu Glu Leu Ile
   50                               55                               60

45

   Phe Arg Tyr Cys Ser Gly Ser Cys Asp Ala Ala Glu Thr Thr Tyr Asp
   65                               70                               75                               80

50

   Lys Ile Leu Lys Asn Leu Ser Arg Asn Arg Arg Leu Val Ser Asp Lys
   85                               90                               95

55  Val Gly Gln Ala Cys Cys Arg Pro Ile Ala Phe Asp Asp Asp Leu Ser
   100                               105                               110

   Phe Leu Asp Asp Asn Leu Val Tyr His Ile Leu Arg Lys His Ser Ala
60                               115                               120                               125

   Lys Arg Cys Gly Cys Ile
65                               130

```

<210> 30
 <211> 139
 <212> PRT
 <213> Mus musculus 5

 <220>
 <223> hBMP-8b 10

 <400> 30
 Thr Ala Arg Pro Leu Lys Lys Lys Gln Leu Asn Gln Ile Asn Gln Leu
 1 5 10 15 15

 Pro His Ser Asn Lys His Leu Gly Ile Leu Asp Asp Gly His Gly Ser
 20 25 30 20

 His Gly Arg Glu Val Cys Arg Thr Gly Glu Leu Tyr Val Ser Phe Arg
 35 40 45 25

 Asp Leu Gly Trp Leu Asp Ser Val Ile Ala Pro Gln Gly Tyr Ser Ala
 50 55 60

 Tyr Tyr Cys Ala Gly Glu Cys Ile Tyr Pro Leu Asn Ser Cys Met Asn
 65 70 75 80 30

 Ser Thr Asn His Ala Thr Met Gln Ala Leu Val His Leu Met Lys Pro
 85 90 95 35

 Asp Ile Ile Pro Lys Val Cys Cys Val Pro Thr Glu Leu Ser Ala Ile
 100 105 110 40

 Ser Leu Leu Tyr Tyr Asp Arg Asn Asn Asn Val Ile Leu Arg Arg Glu
 115 120 125 45

 Arg Asn Met Val Val Gln Ala Cys Gly Cys His
 130 135

 50

Patentansprüche

1. Mutein einer Kette eines Proteins aus der Superfamilie des Wachstumsfaktors TGF- β , wobei das Mutein nach Bildung eines Homodimers antagonistische und/oder partiell agonistische Aktivität aufweist und wobei das Mutein an einer oder mehreren Position(en) verändert ist, die im unveränderten Protein an einer niederaffinen Bindung an seinen Rezeptor beteiligt ist/sind. 55
2. Mutein nach Anspruch 1, wobei das Mutein durch Deletion und/oder Substitution und/oder Insertion und/oder Modifikation einer oder mehrerer Aminosäuren verändert ist.
3. Mutein nach Anspruch 1 oder 2, wobei das Mutein von einer Kette eines BMP-2-ähnlichen Proteines abgeleitet ist und im Mutein eine oder mehrere Position(en) aus dem "Knuckle"-Epitop verändert ist/sind. 60
4. Mutein nach Anspruch 3, wobei das BMP-2-ähnliche Protein aus der Gruppe ausgewählt ist, die BMP-2, BMP-4, BMP-5, BMP-6, BMP-7, GDF-5, GDF-6 und GDF-7 umfaßt.
5. Mutein nach einem der Ansprüche 3 oder 4, dadurch gekennzeichnet, daß eine oder mehrere Aminosäure(n), ausgewählt aus der Gruppe der Aminosäuren, die die oberflächenexponierten Bereiche aus den β -Faltblattstrukturen $\beta 3$, $\beta 4$, $\beta 7$, $\beta 8$ und/oder $\beta 9$ bilden, deletiert und/oder substituiert und/oder modifiziert ist/sind und/oder daß mindestens einer der genannten oberflächenexponierten Bereiche durch Insertion einer oder mehrerer Aminosäuren verändert ist. 65
6. Mutein nach einem der Ansprüche 3 oder 4, dadurch gekennzeichnet, daß mindestens eine der die β -Faltblätter

$\beta 3$ und $\beta 4$ verbindenden Aminosäuren deletiert und/oder substituiert und/oder modifiziert ist und/oder daß in den die β -Faltblätter $\beta 3$ und $\beta 4$ verbindenden Aminosäurebereich ein oder mehrere Aminosäuren inseriert sind.

7. Mutein nach einem der Ansprüche 3 bis 6, dadurch gekennzeichnet, daß mindestens eine der folgenden Aminosäuren deletiert, substituiert und/oder modifiziert ist, wobei sich die Positionsangaben auf BMP-2 beziehen:

5 V33 A34 P35 P36 G37 Y38 H39 F41 Y42 T82 E83 L84 S85 A86 I87 S88 L90 K97 V98 V99 L100 V107 E109 und G110.

8. Mutein nach einem der Ansprüche 1 bis 7, dadurch gekennzeichnet, daß es mindestens 50% Identität mit einer Kette eines BMP-2-ähnlichen Wachstumsfaktors aus der TGF- β -Superfamilie hat und antagonistische und/oder partiell agonistische Aktivität aufweist.

9. Mutein nach einem der Ansprüche 1 oder 2, wobei das Mutein von einem Protein der TGF- β -Aktivin-Familie abgeleitet ist und im Mutein eine oder mehrere Position(en) aus dem "Wrist"-Epitop verändert ist/sind.

10. Mutein nach Anspruch 9, wobei das Protein der TGF- β -Aktivin-Familie aus der Gruppe ausgewählt ist, die TGF- $\beta 1$, TGF- $\beta 2$, TGF- $\beta 3$, Aktivine, Inhibine, BMP-11 und GDF-8 umfaßt.

11. Mutein nach einem der Ansprüche 9 oder 10, dadurch gekennzeichnet, daß mindestens eine Aminosäure, ausgewählt aus der Gruppe der Aminosäuren, die die oberflächenexponierten Bereiche aus der Helix vor der Faltblattstruktur $\beta 1$, der Faltblattstruktur $\beta 1$, der langen Schleife zwischen den Faltblattstrukturen $\beta 2$ und $\beta 3$, der Schlaufe vor der Helix $\alpha 3$, der Helix $\alpha 3$ sowie der Faltblattstruktur $\beta 8$ bilden, deletiert und/oder substituiert und/oder modifiziert ist/sind und/oder daß mindestens einer der genannten oberflächenexponierten Bereiche durch Insertion einer oder mehrerer Aminosäuren verändert ist.

12. Mutein nach mindestens einem der Ansprüche 9 bis 11, dadurch gekennzeichnet, daß mindestens eine der folgenden Aminosäuren deletiert, substituiert und/oder modifiziert ist, wobei sich die Positionsangaben auf BMP-2 beziehen:

20 K5, S13, V26, G27, W28, N29, D30, W31, P48, F49, P50, A52, D53, H54, N59, I62, V63, L66, N68, S69, V70, K101 und Y103.

13. Mutein nach einem der Ansprüche 1 bis 12, dadurch gekennzeichnet, daß es mindestens 50% Identität mit einer Kette eines TGF- β -Aktivin-ähnlichen Wachstumsfaktors aus der TGF- β -Superfamilie hat und antagonistische und/oder partiell agonistische Aktivität aufweist.

14. Mutein nach einem der Ansprüche 1 bis 13, dadurch gekennzeichnet, daß es mit einem zielspezifischen Molekül kovalent verbunden ist.

15. Mutein nach Anspruch 14, dadurch gekennzeichnet, daß das zielspezifische Molekül mit dem Mutein ein Fusionsprotein bildet.

16. Derivat eines Proteins aus der TGF- β -Superfamilie, umfassend ein Mutein gemäß einem der Ansprüche 1 bis 15 und eine weitere Kette eines Proteins aus der Gruppe der TGF- β -Superfamilie oder ein weiteres Mutein gemäß einem der Ansprüche 1 bis 15.

17. Derivat nach Anspruch 16, umfassend ein Homodimer aus Muteinen gemäß einem der Ansprüche 1 bis 15.

18. Derivat nach Anspruch 16, umfassend ein Heterodimer aus Muteinen gemäß einem der Ansprüche 1 bis 15.

19. Pharmazeutische Zusammensetzung, umfassend mindestens ein Mutein gemäß einem der Ansprüche 1 bis 15 und/oder ein Derivat gemäß einem der Ansprüche 16 bis 18 und/oder ein pharmazeutisch verträgliches Salz davon.

20. Verwendung eines Muteins nach einem der Ansprüche 1 bis 15 und/oder eines Derivates nach einem der Ansprüche 16 bis 18 zum Herstellen einer Zusammensetzung zur Prophylaxe und/oder Behandlung von Erkrankungen, die durch ein Protein aus der Superfamilie des Wachstumsfaktors TGF- β vermittelt werden.

21. Antikörper gegen ein Mutein nach einem der Ansprüche 1 bis 15 oder ein Derivat gemäß einem der Ansprüche 16 bis 18.

22. Nukleinsäure, enthaltend eine Nukleinsäuresequenz, ausgewählt aus:

- 45 (i) einer für ein Mutein nach einem der Ansprüche 1–15 kodierenden Nukleinsäuresequenz;
- (ii) einer zu der Nukleinsäuresequenz nach (i) komplementären Nukleinsäuresequenz und
- (iii) einer Nukleinsäuresequenz, die mit einer Nukleinsäuresequenz nach (ii) hybridisiert und für ein Mutein kodiert, das nach Bildung eines Homodimers antagonistische oder partiell agonistische Aktivität aufweist.

23. Nukleinsäure nach Anspruch 22, dadurch gekennzeichnet, daß die Hybridisierung nach (iii) unter stringenten Bedingungen durchgeführt wird.

24. Nukleinsäure nach Anspruch 19, dadurch gekennzeichnet, daß die Nukleinsäure genomische DNA, cDNA, synthetische DNA oder RNA ist.

25. Nukleinsäure gemäß einem der Ansprüche 22 bis 24, weiterhin umfassend einen zur Expressionskontrolle geeigneten Promotor, wobei die für ein Mutein kodierende Nukleinsäuresequenz unter der Kontrolle des Promotors steht.

26. Vektor, enthaltend eine Nukleinsäure nach einem der Ansprüche 22 bis 28.

27. Wirtsorganismus, enthaltend eine Nukleinsäure nach einem der Ansprüche 22 bis 25 oder ein Vektor nach Anspruch 26.

28. Verfahren zum Herstellen eines Muteins gemäß einem der Ansprüche 1–15, umfassend das Kultivieren eines Wirtsorganismus gemäß Anspruch 27 unter zur Expression geeigneten Bedingungen und ggf. das Aufreinigen des exprimierten Muteins.

Hierzu 15 Seite(n) Zeichnungen

65

- Leerseite -

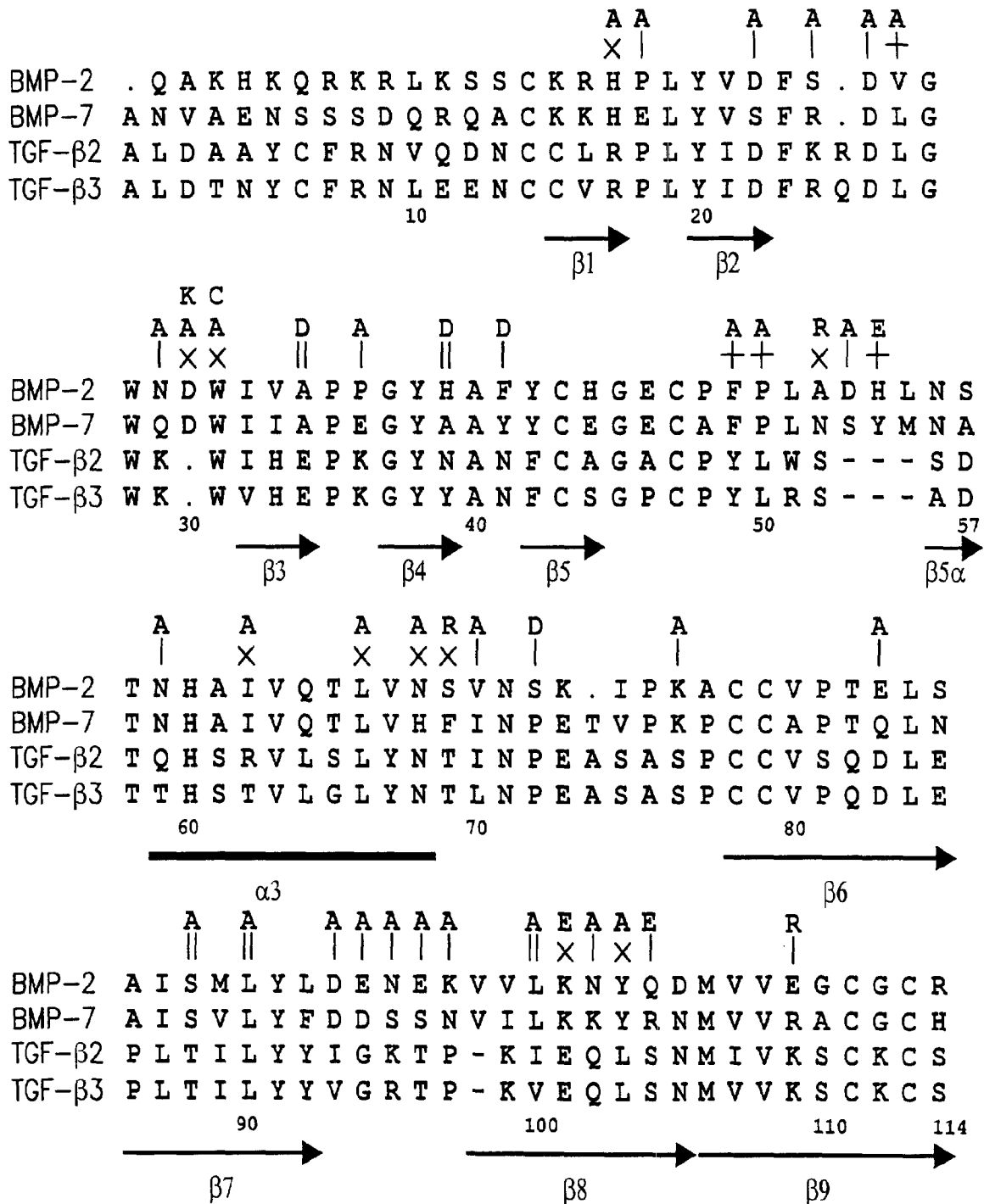


FIG. 1

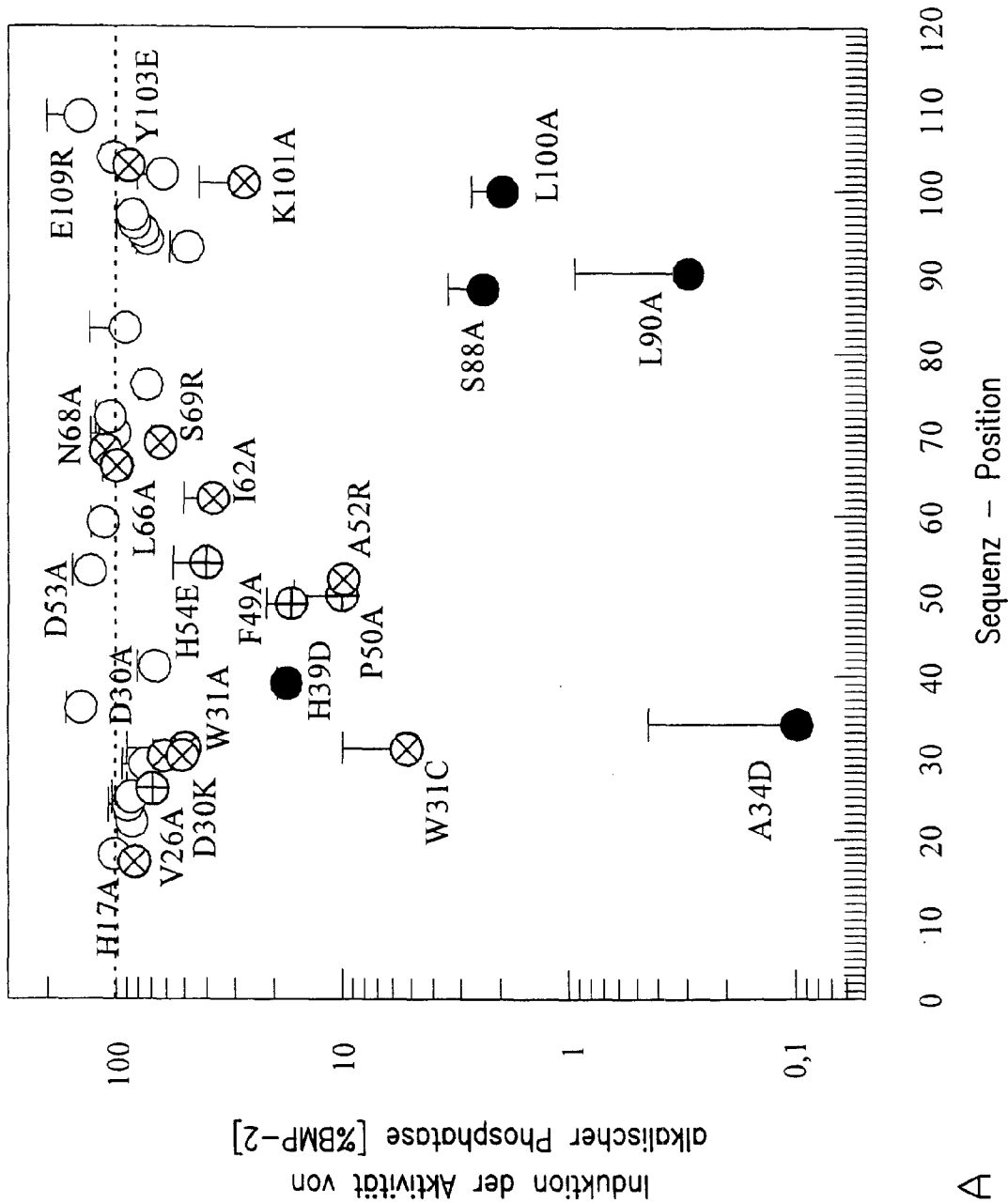


FIG. 2A

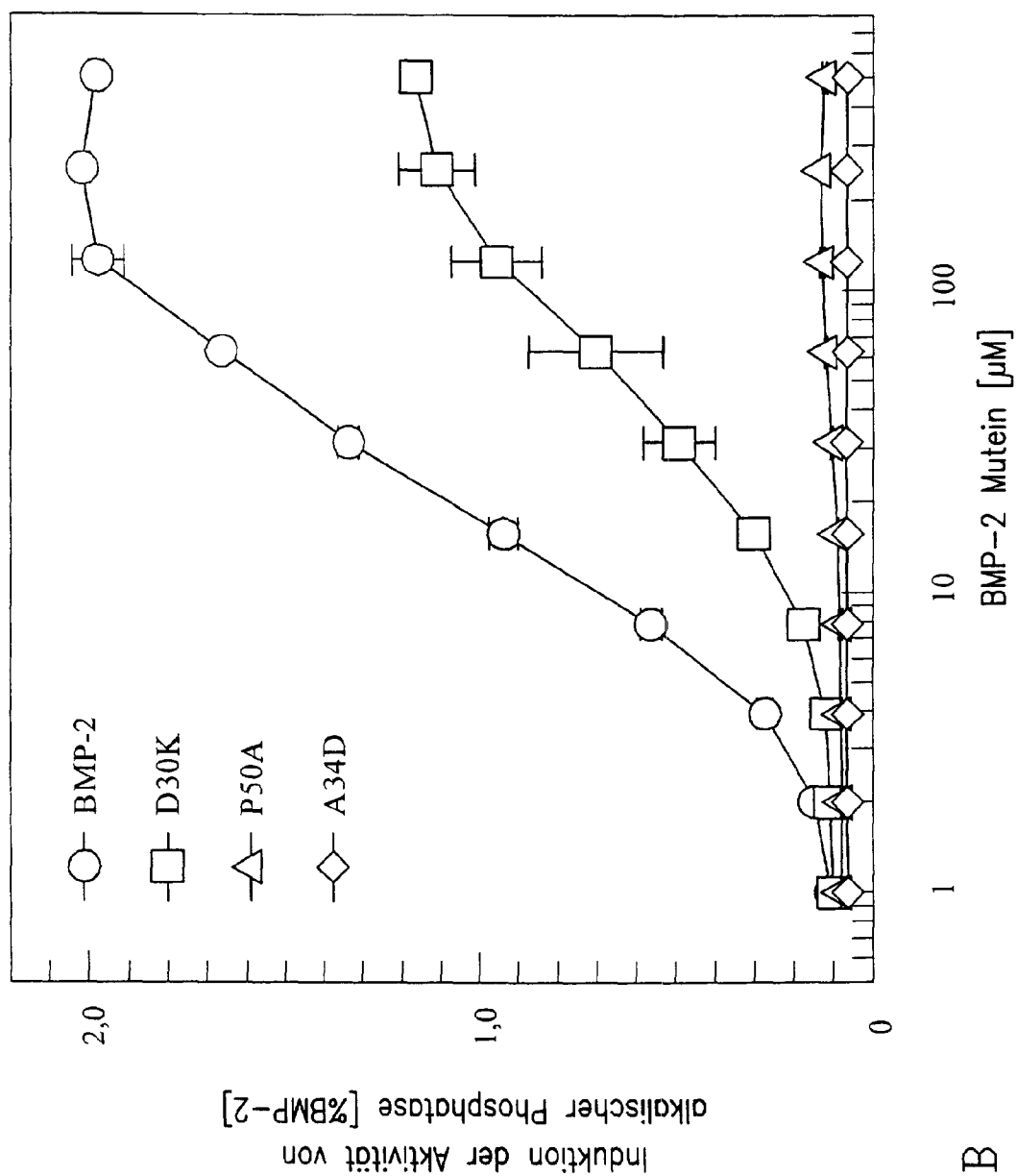


FIG. 2B

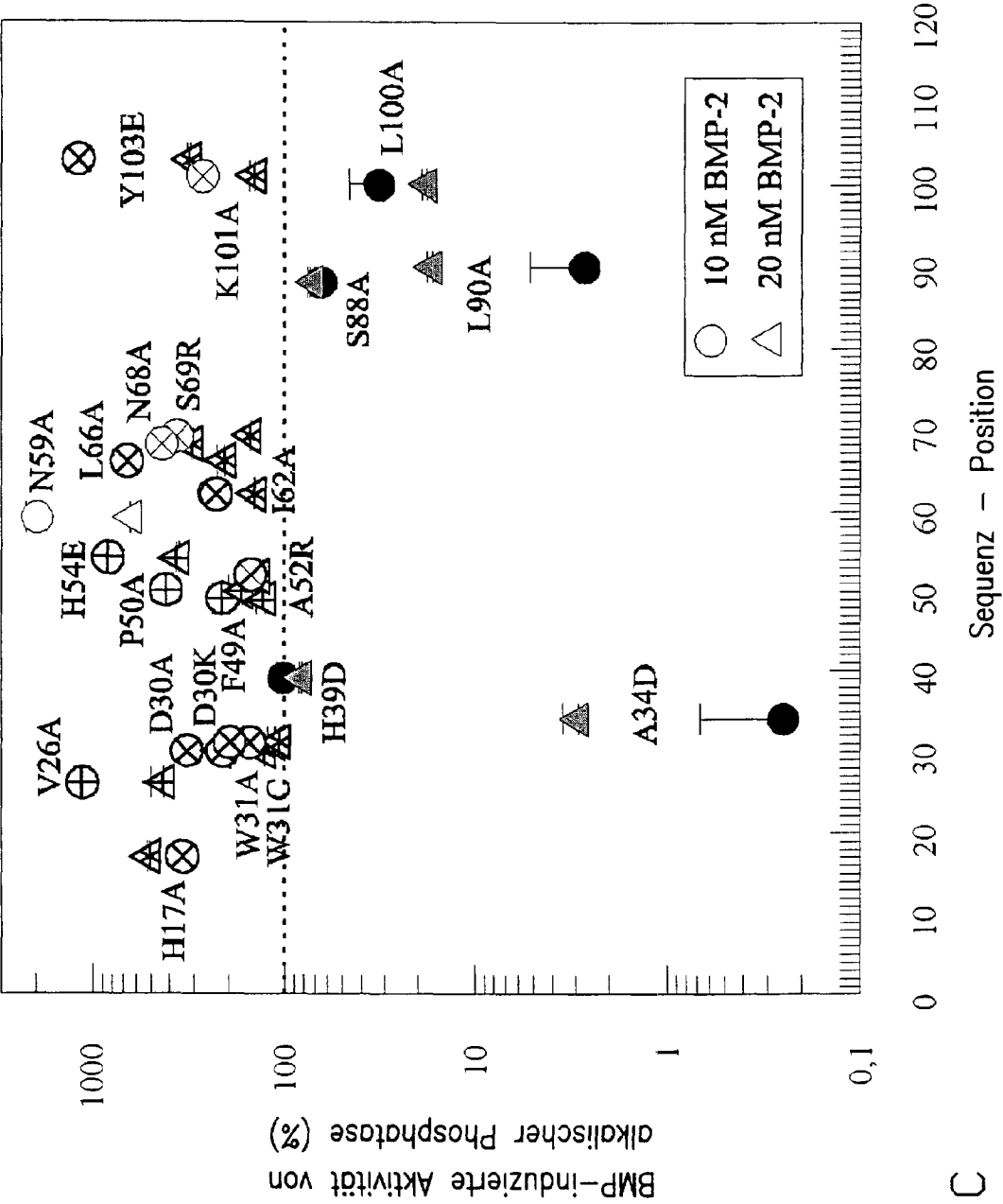


FIG. 2C

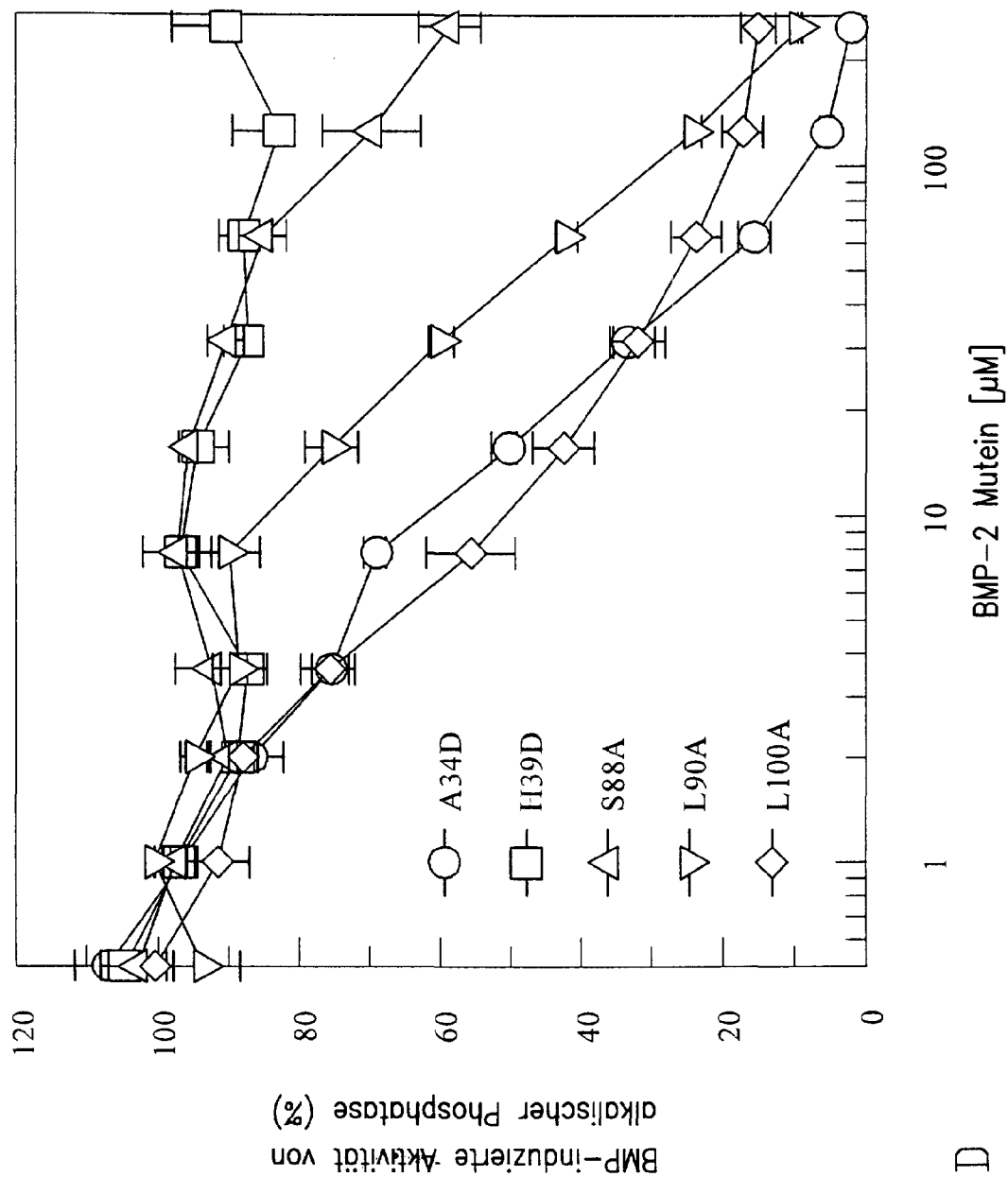


FIG. 2D

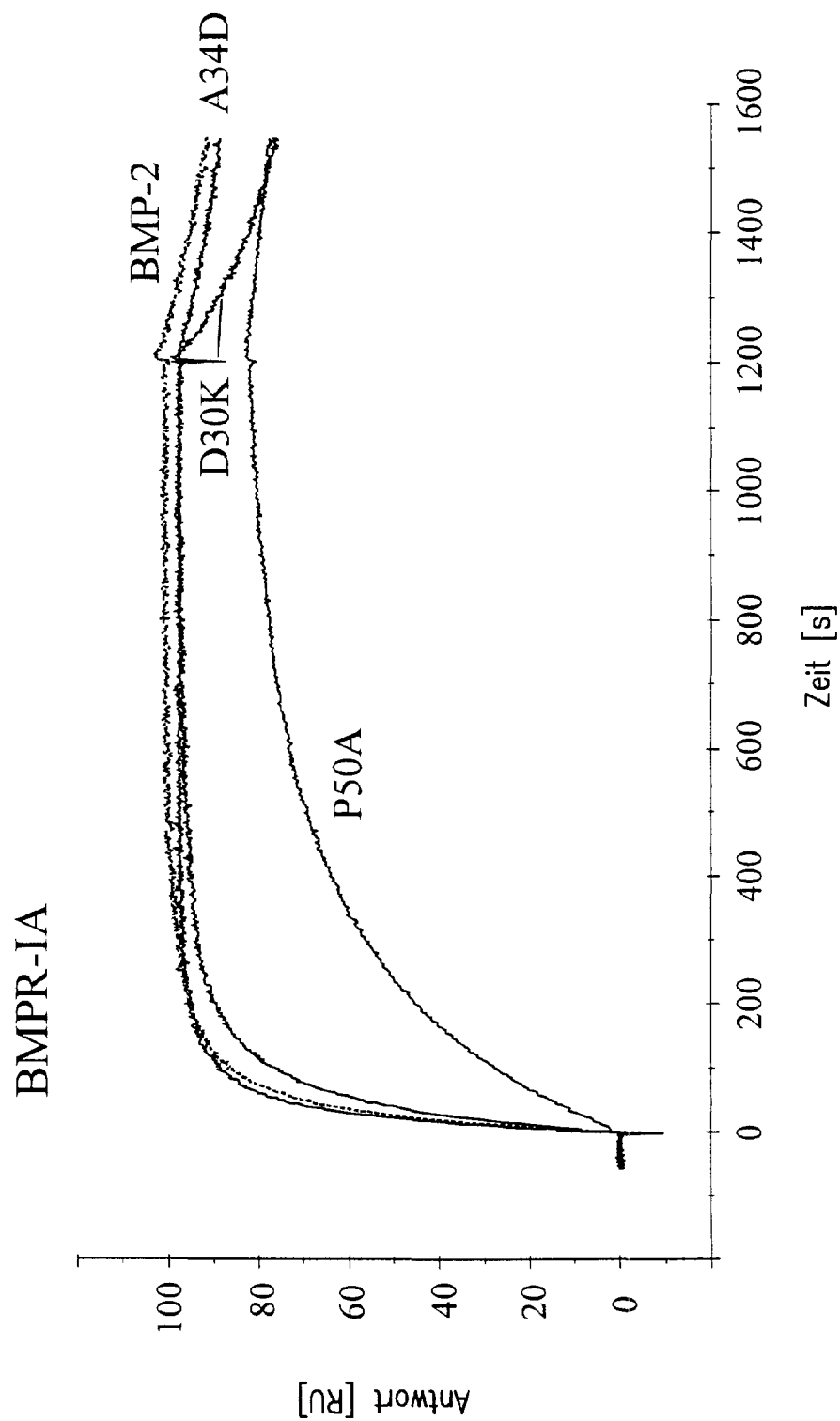


FIG. 3A

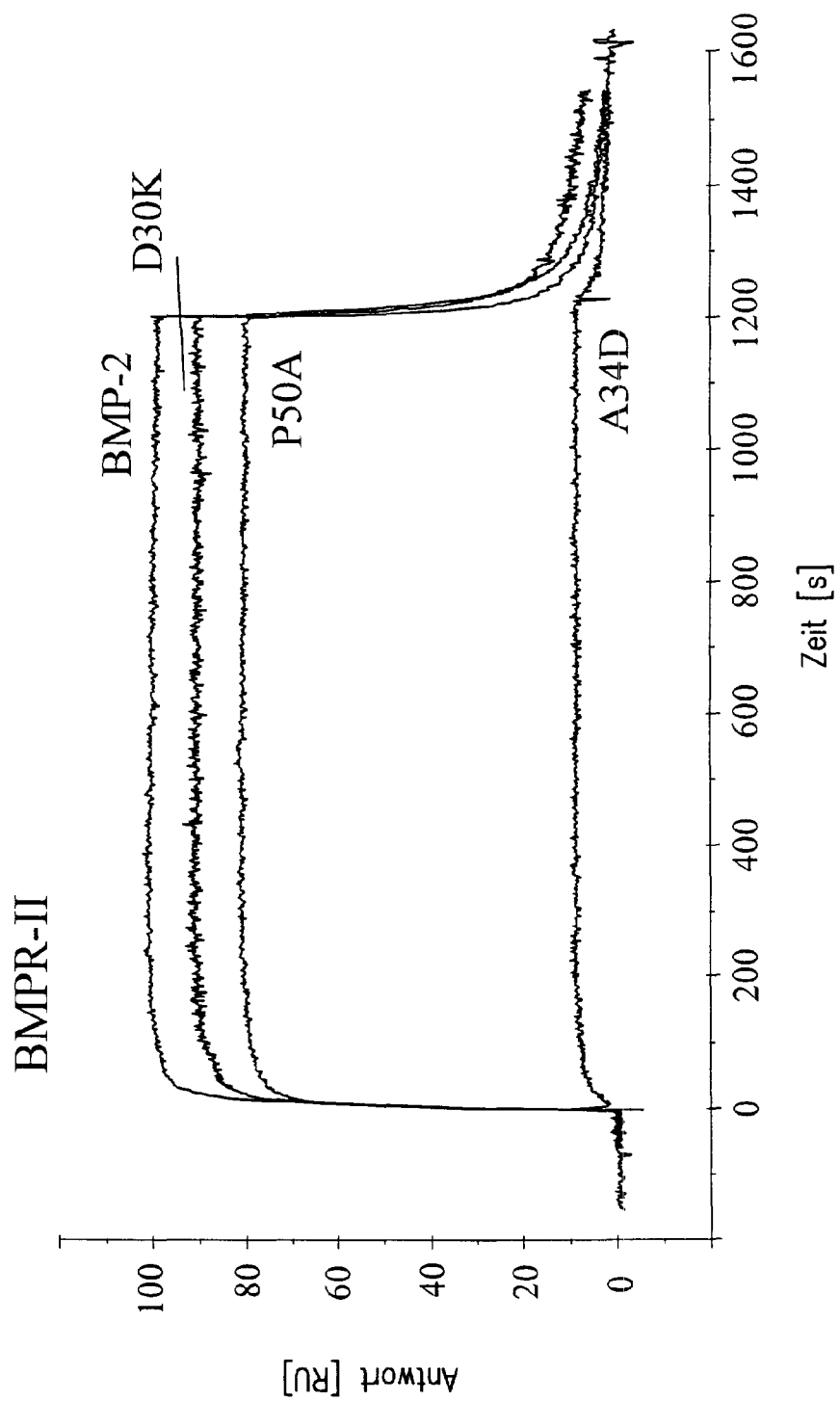


FIG. 3B

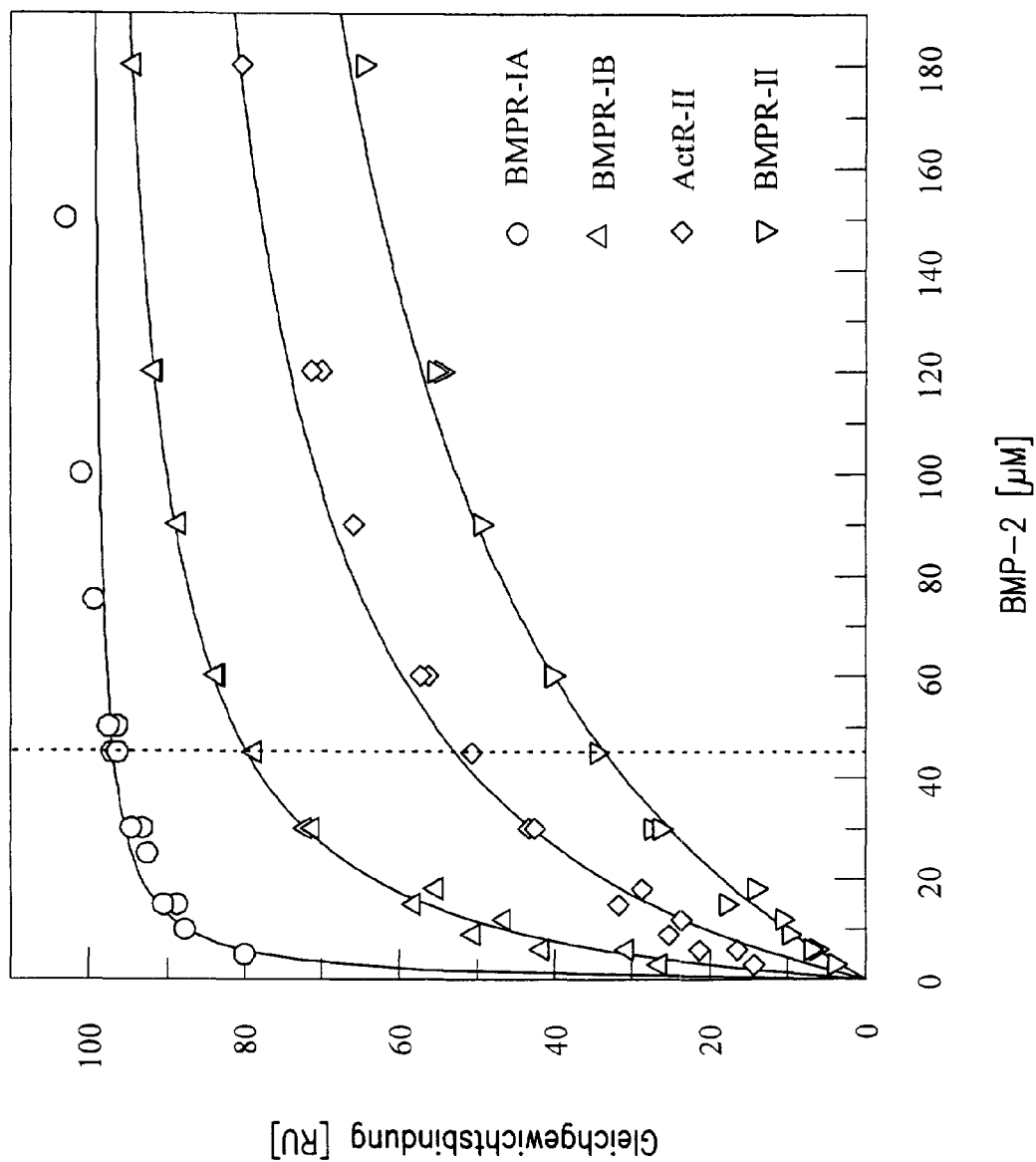


FIG. 4A

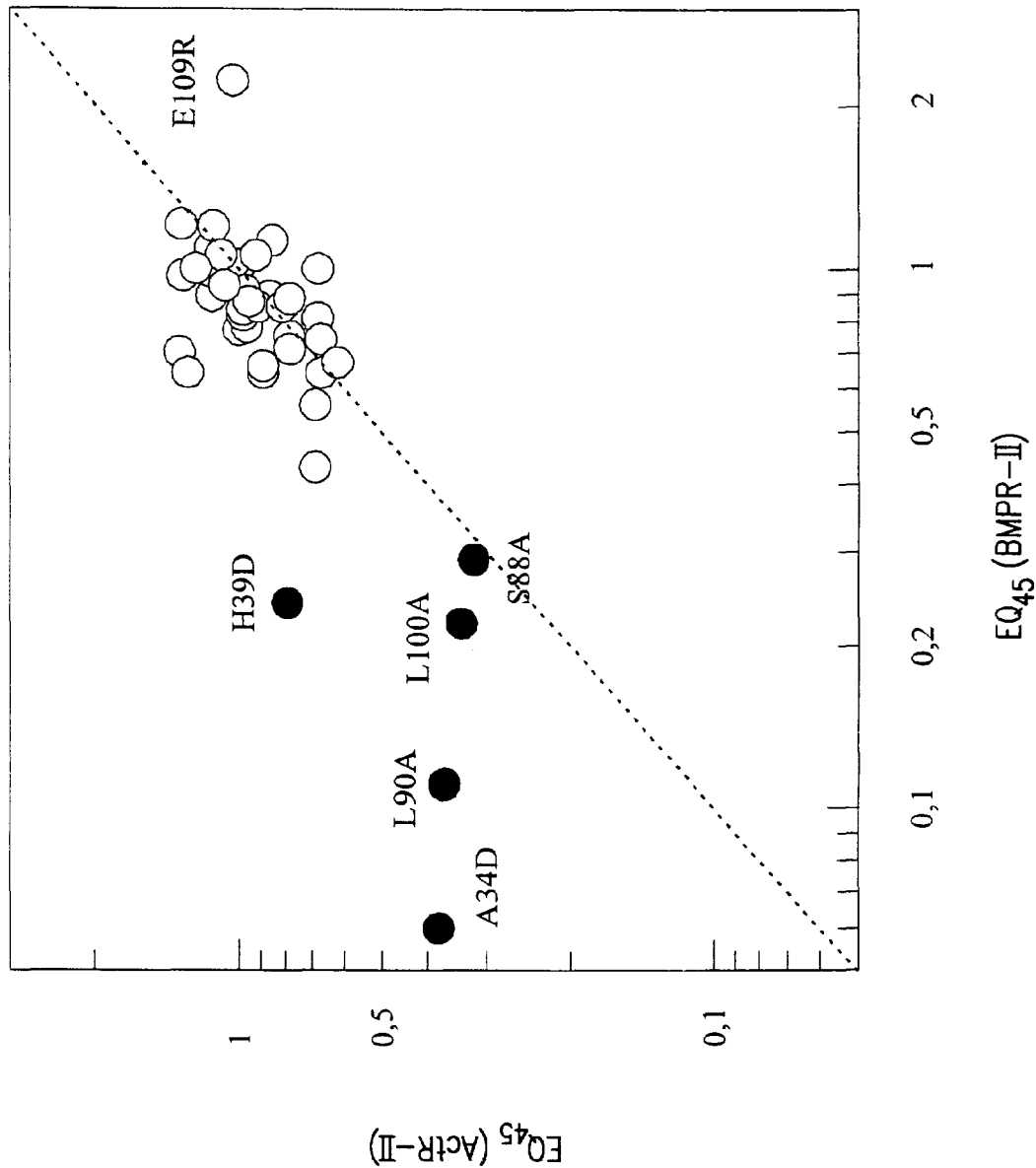


FIG. 4B

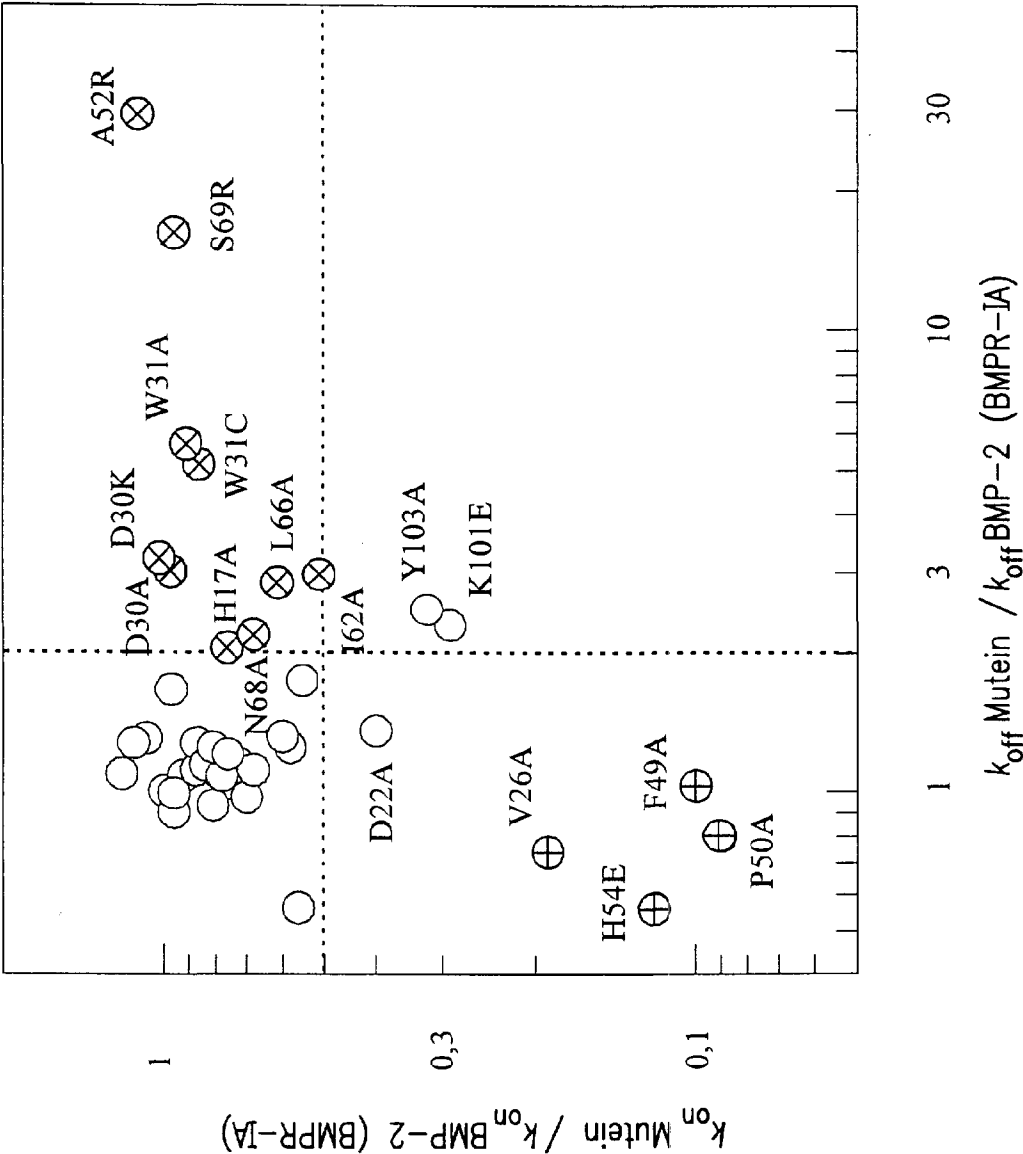


FIG. 4C

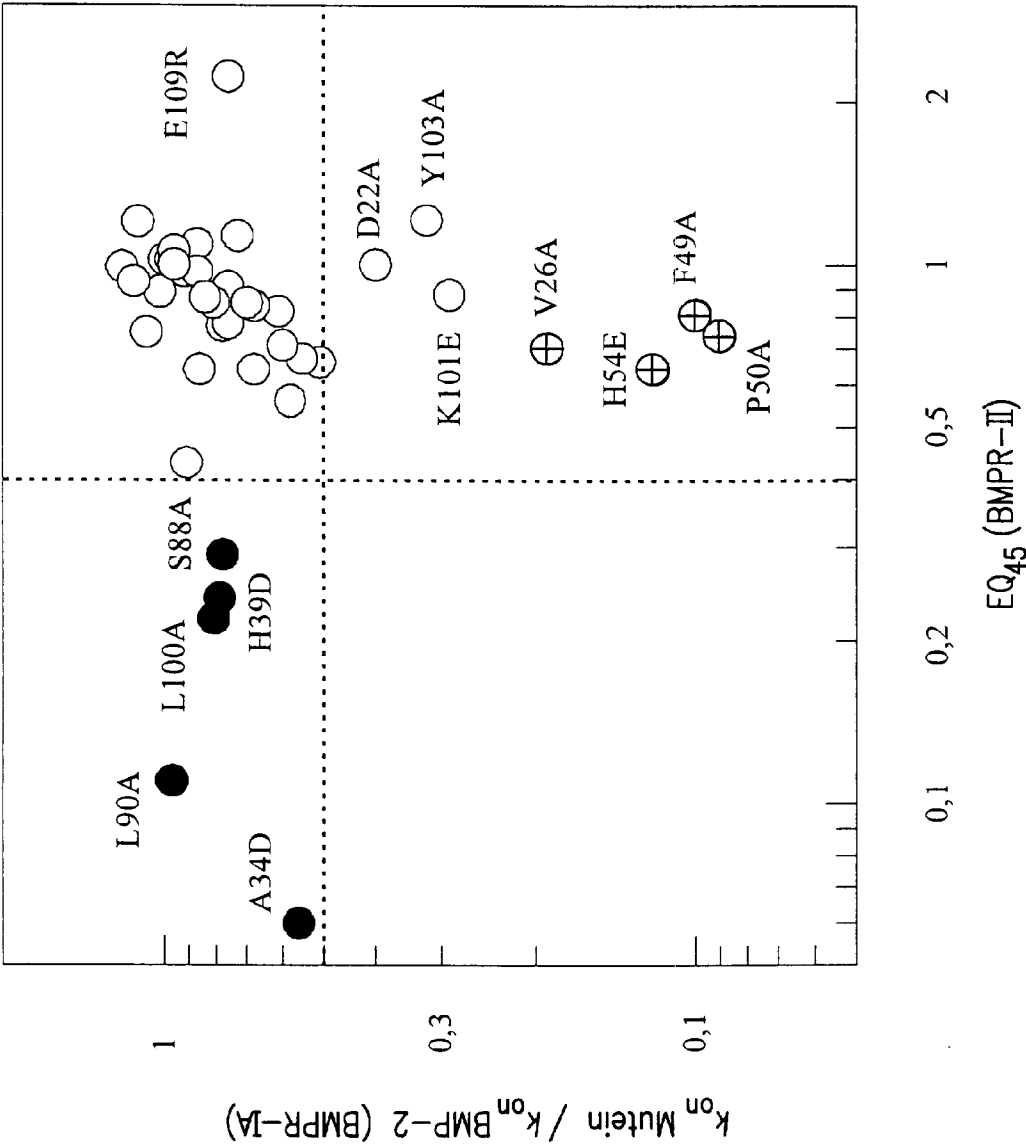


FIG. 4D

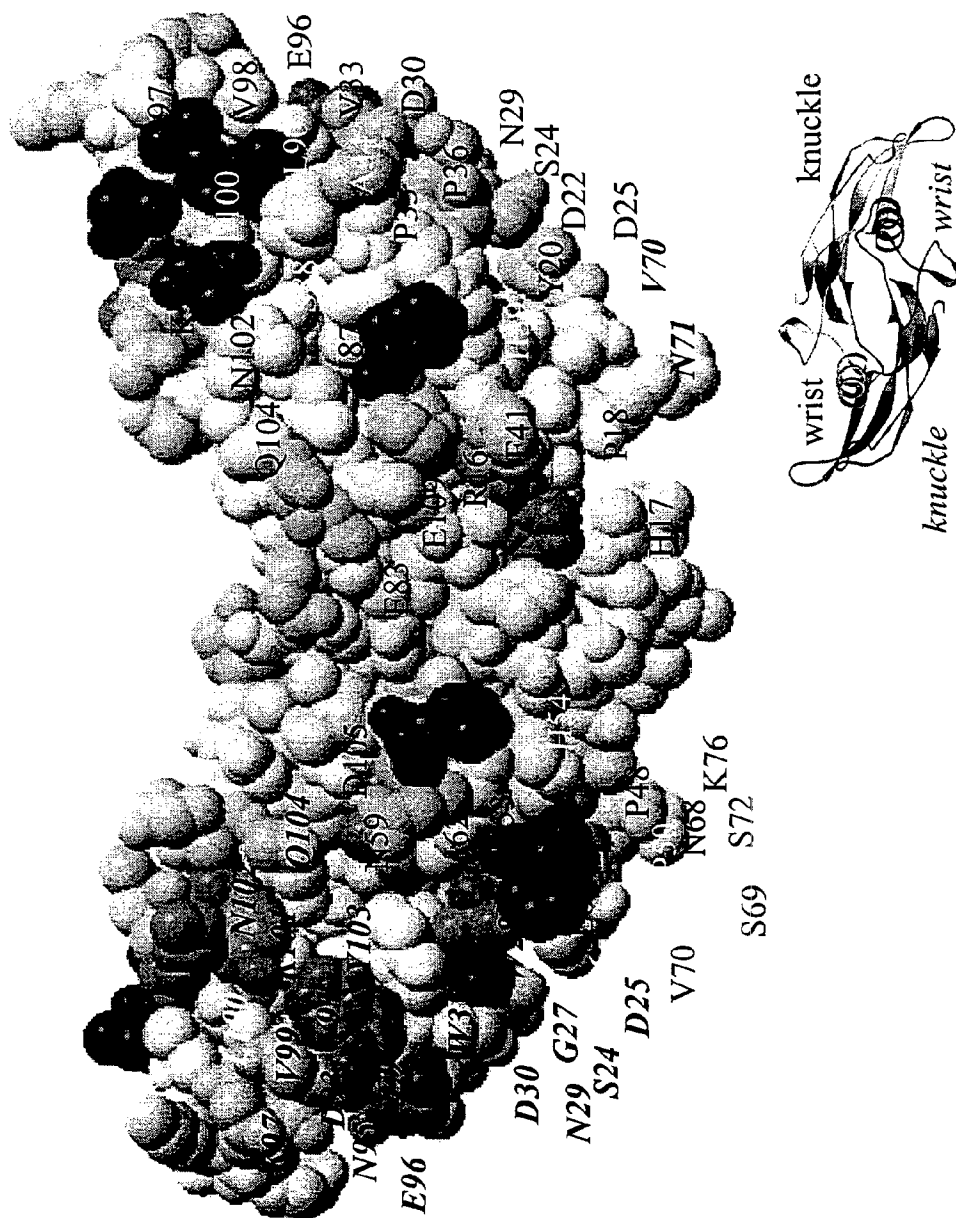


FIG. 5

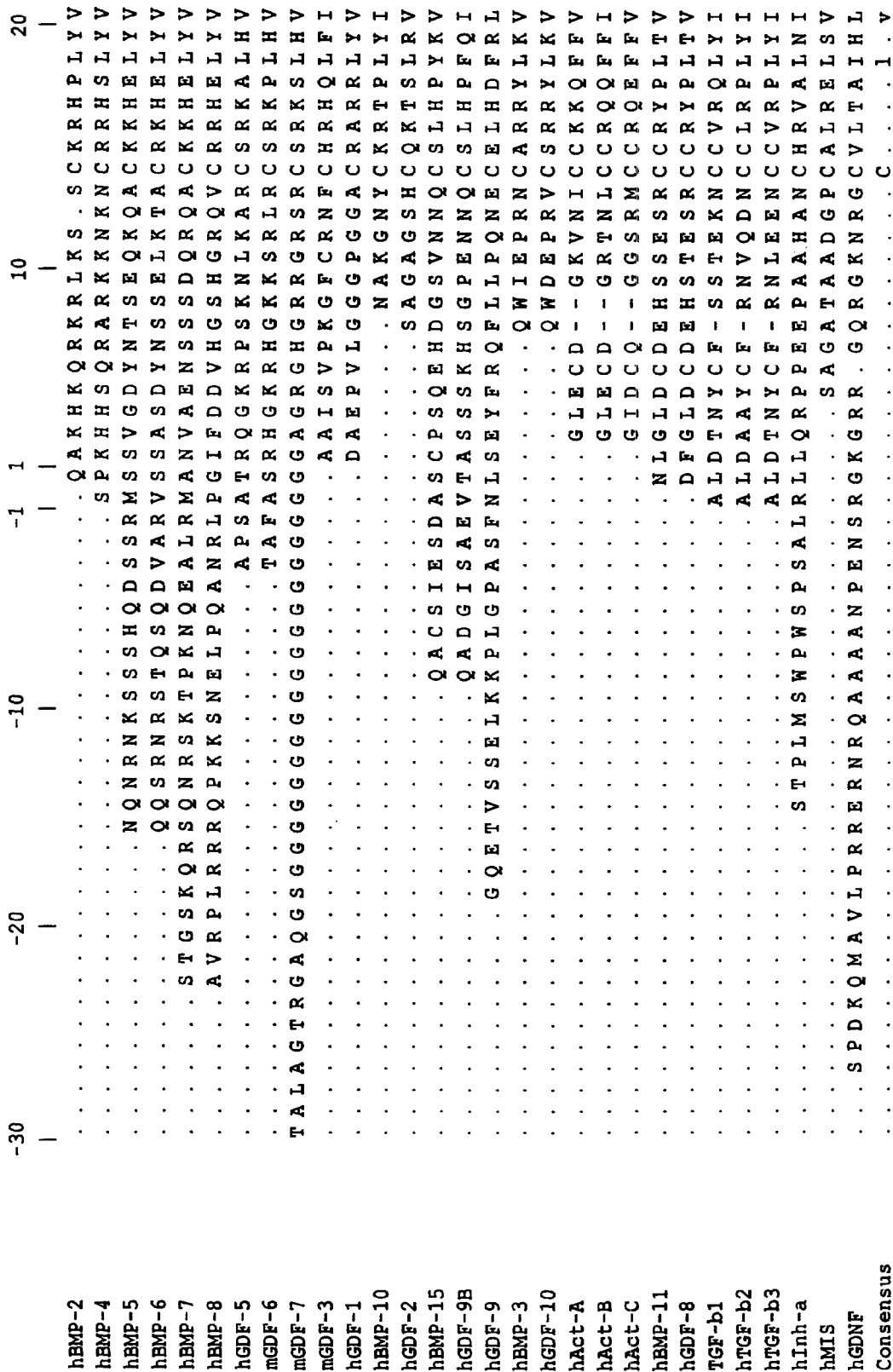


FIG. 6A

	30	40	50	60
hEMP-2	D F S - D V G W N D W I V A P P G Y H A F Y C H G E C P F P L A D H L N S T N H A I V Q T L V N			
hEMP-4	D F S - D V G W N D W I V A P P G Y Q A F Y C H G D C P F P L A D H L N S T N H A I V Q T L V N			
hEMP-5	S F R - D L G W Q D W I I A P E G Y A A F Y C D G E C S F P L N A H M N A T N H A I V Q T L V H			
hEMP-6	S F Q - D L G W Q D W I I A P K G Y A A N Y C D G E C S F P L N A H M N A T N H A I V Q T L V H			
hEMP-7	S F R - D L G W Q D W I I A P E G Y A A Y Y C E G E C A F P L N S Y M N A T N H A I V Q T L V H			
hEMP-8	S F Q - D L G W L D W V I A P Q G Y S A Y Y C E G E C S F P L D S C M N A T N H A I L Q S L V H			
hGDF-5	N F K - D M G W D D W I I A P L E Y E A F H C E G L C E F P L R S H L E P T N H A V I Q T L M N			
mGDF-6	N F K - E L G W D D W I I A P L E Y E A Y H C E G V C D F P L R S H L E P T N H A I I Q T L M N			
mGDF-7	D F K - E L G W D D W I I A P L D Y E A Y H C E G V C D F P L R S H L E P T N H A I I Q T L L N			
mGDF-3	N F Q - D L G W H K W V I A P K G F M A N Y C H G E C P F S M T T Y L N S S N Y A F M Q Q A L M H			
hGDF-1	S F R - E V G W H R W V I A P R G F L A N Y C Q G Q C A L P V A L S G S G P A L N H A V L R A L M H			
hEMP-10	D F K - E I G W D S W I I A P P G Y E A Y E C R G V C N Y P L A E H L T P T K H A I I Q A L V H			
hGDF-2	N F E - D I G W D S W I I A P K E Y E A Y E C K G C C F F P L A D D V T P T K H A I V Q T L V H			
hEMP-15	S F H - Q L G W D H W I I A P R L Y T P N Y C K G I C T R V L P Y G L N S P N H A I I Q S L V N			
hGDF-9B	S F R - Q L G W D H W I I A P P F Y T P N Y C K G T C L R V L R D G L N S P N H A I I Q N L I N			
hGDF-9	S F S - Q L K W D N W I V A P H R Y N P R Y C K G D C P R A V G H R Y G S P V H T M V Q N I I Y			
hEMP-3	D F A - D I G W S E W I I S P K S F D A Y Y C S G A C Q F P M P K S L K P S N H A T I Q S I V R			
hGDF-10	D F A - D I G W N E W I I S P K S F D A Y Y C A G A C E F P M P K I V R P S N H A T I Q S I V R			
hAct-A	S F K - D I G W N D W I I A P S G Y H A N Y C E G E C P S H I A G T S G S S L . S F H S T V I N H Y R M			
hAct-B	D F R - L I G W N D W I I A P T G Y Y G N Y C E G S C P A Y L A G V P G S A S . S F H T A V N Q Y R M			
hAct-C	D F R - E I G W H D W I I Q P E G Y A M N F C I G Q C F L H I A G M P G I A A . S F H T A V L N L L K A			
hEMP-11	D F E - A F G W - D W I I A P K R Y K A N Y C S G Q C E Y M F M - - - Q K Y P H T H L V Q			
hGDF-8	D F E - A F G W - D W I I A P K R Y K A N Y C S G E C E F V F L - - - Q K Y P H T H L V H			
TGF-b1	D F R K D L G W K - W I H E P K G Y H A N F C L G P C P Y I W S - - - L D T Q Y S K V L A L Y N			
hTGF-b2	D F R K D L G W K - W I H E P K G Y N A N F C A G A C P Y L W S - - - S D T Q H S R V L S L Y N			
hTGF-b3	D F R Q D L G W K - W V H E P K G Y Y A N F C S G P C P Y L R S - - - A D T T H S T V L G L Y N			
hInh-a	S F Q - E L G W E R W I V Y P P S F I F H Y C H G G C G L H I P P N L S L P V P G A P P T P A Q P			
hMIS	D L R - A . . . E R S V L I P E T Y Q A N N C Q G V C G W P Q S D R N P R Y G N H V V L L L K M			
hGDNF	N V T - D L G L G . . Y E T K E E L I F R Y C S G S C D A A E T T Y D K I L K N L S R N			
Consensus	. f . . g w . . w ! i a p . . % . a . y . C . G . C h a l			

FIG. 6B

hBMP-2	SV . NSK - I P K A C C V P T E L S A I S M L Y L D E N E K V V L K . N Y Q D M V V E G C G C R	70	80	90	100	110
hBMP-4	SV . NSS - I P K A C C V P T E L S A I S M L Y L D E Y D K V V L K . N Y Q E M V V E G C G C R					
hBMP-5	LM . F P D H V P K P C C A P T K L N A I S V L Y F D D S S N V I L K . K Y R N M V V R S C G C H					
hBMP-6	LM . N P E Y V P K P C C A P T K L N A I S V L Y F D D S S N V I L K . K Y R N M V V R A C G C H					
hBMP-7	FI . N P E T V P K P C C A P T Q L N A I S V L Y F D D S S N V I L K . K Y R N M V V R A C G C H					
hBMP-8	LM . K P N A V P K A C C A P T K L S A T S V L Y Y D S S N N V I L R . K H R N M V V K A C G C H					
hGDF-5	SM . D P E S T P P T C C V P T R L S P I S I L F I D S A N N V V Y K . Q Y E D M V V E S C G C R					
mGDF-6	SM . D P G S T P P S C C V P T K L T P I S I L Y I D A G N N V V Y K . Q Y E D M V V E S C G C R					
mGDF-7	SM . A P D A A P A S C C V P A R L S P I S I L Y I D A A N N V V Y K . Q Y E D M V V E A C G C R					
mGDF-3	MA . D P . K V P K A V C V P T K L S P I S M L Y Q D S D K N V I L R . H Y E D M V V D E C G C G					
hGDF-1	AA . A P G A A D L P C C V P A R L S P I S V L F F D N S D N V V L R . Q Y E D M V V D E C G C R					
hBMP-10	LK . N S Q K A S K A C C V P T K L E P I S I L Y L D K . G V V T Y K F K Y E G M A V S E C G C R					
hGDF-2	LK . F P T K V G K A C C V P T K L S P I S V L Y K D D M G V P T L K Y H Y E G M S V A E C G C R					
hBMP-15	EL . V N H S V P Q P S C V P Y N F L P M S I L L I E T N G S I L Y K . E Y E G M I A Q S C T C R					
hGDF-9B	QL . V D Q S V P R P S C V P Y K Y V P I S V L M I E A N G S I L Y K . E Y E G M I A E S C T C R					
hGDF-9	EK . L D S S V P R P S C V P A K Y S P L S V L T I E P D G S I A Y K . E Y E D M I A T K C T C R					
hBMP-3	AVGVVPGIPEPCCVPEKMSLSILFFDENKNVVLK.VYPNMTVESCA CR					
hGDF-10	AVGIIPGIPEPCCVPKMNSLGLFLDENRNVLK.VYPNMSVDTCA CR					
hAct-A	RGHSPPFANLKS CCVPTKLRPFMSMLYDDGQNIKK.DIQNMIVEECGCS					
hAct-B	RGLNP.GTVNSCCIPTKLSTMSMLYFDDDEYNIVKR.DVPNMIVEECGCA					
hAct-C	NTAGTTGGSCCVPTARRPLSLLYYDRDSNIVKT.DIPDMVVEACGCS					
hBMP-11	QA.NPRGSAGPCCTPTKMSPINMMLYFNDKQIIYG.KIPGMVVDRCGCS					
hGDF-8	QA.NPRGSAGPCCTPTKMSPINMMLYFNKGKEQIIYG.KIPAMVVDRCGCS					
TGF-b1	QH.NPGASAAAPCCVPALEPLPIVYVGRKPKVE..QLSNMIVRSCKCS					
hTGF-b2	TI.NPEASASPCCVSQDLEPLTILYIYIGKTPKIE..QLSNMIVRSCKCS					
hTGF-b3	TL.NPEASASPCCVSQDLEPLTILYIYVGRTPKVE..QLSNMIVRSCKCS					
hInh-a	YSLLPGAQPCCAALPGTMRPLHVRTTSDGGYSFKYETVPPNLLTQHACAI					
hMIS	QARGAALARPCCVPTAYAGKLLISLSEERISAH..HVPNMMVATECGCR					
hGDNF	RRLVSDKVGQAACCRPIAFDD.DLSFLDDNLVYHI...LRKHS AKRCGCI					
Consensus	...p...c c v p t . l . p . s . l y . d \$. v . . C g C .					

FIG. 6C